



José Miguel da Cunha Coelho Rebelo

**Pétalas da Flor de Açafrão (*Crocus sativus* L.):
Valorização de um Subproduto**

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos conducente ao Grau de Mestre em Controlo de Qualidade

**Trabalho realizado sob a orientação de:
Prof. Doutora Beatriz Oliveira
Mestre Anabela Guedes Costa**

**Porto
Julho
2014**

É autorizada a reprodução integral desta dissertação apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado que a tal se compromete.

Agradecimentos

À Prof.^a Doutora Beatriz Oliveira agradeço todas as linhas orientadoras pelas quais me consegui guiar e por me ter disponibilizado todas as condições necessárias à realização deste projeto, para além da preocupação e disponibilidade.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Anabela Costa que sempre acompanhou o meu trabalho e me ajudou imenso mesmo quando tudo parecia estar perdido.

À Doutora Carla Costa, Doutor João Barreira, Maria João e restante departamento de biologia molecular do Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge, agradeço o apoio, orientação e os bons momentos.

À Doutora Raquel Branquinho e à Doutora Rita Alves agradeço a constante disponibilidade e encorajamento.

Aos meus amigos que sempre me deram os melhores momentos e que me fazem lembrar que as amizades não duram para sempre mas enquanto existem nada as iguala.

Agradeço à minha mãe, irmã e pai pela paciência, conselhos, amizade e ânimo.

À Inês, pelo apoio incondicional, companhia e aventuras.

Resumo

A sustentabilidade é um desafio que a sociedade atual tem de superar. Dentro dessa política e no âmbito alimentar, impõem-se a necessidade de produzir alimentos para a população crescente do planeta sem destruir os recursos. Para tal, a reutilização de resíduos e a valorização de subprodutos deverá estar na ordem do dia. Em resposta ao referido, este trabalho pretendeu valorizar as pétalas de *Crocus sativus* L., resultantes da produção do açafrão, a especiaria mais cara do mundo.

Num primeiro estudo procedeu-se à obtenção de 3 extratos (aquoso, etanólico, hidroalcoólico). A escolha do extrato que melhor respondia ao que se pretendia foi baseada no teor de compostos fenólicos totais. Nestes extratos foi ainda feito um *screening* composicional fazendo-se a pesquisa de açúcares, açúcares redutores, alcaloides, fenólicos, flavonoides, taninos e terpenóides. Não foram detetados apenas açúcares redutores e alcaloides.

No extrato escolhido (hidroalcoólico (1:1), 1 g/L, 1h, 40 °C) quantificou-se o teor total em antocianinas, compostos fenólicos, flavonoides e taninos. Foi ainda determinada a atividade antioxidante usando os ensaios DPPH, *β-carotene bleaching* e FRAP. Posteriormente foi determinada a citotoxicidade e a atividade antimicrobiana.

Foram obtidos os valores de antocianinas totais (56,6 mg [EC]/g), compostos fenólicos totais (41,6 mg [EAG]/g), flavonoides totais (19,0 mg [EC]/g) e taninos totais (4,8 mg [EAT]/100g) para o extrato referido.

A melhor capacidade de captação do DPPH• ($EC_{50} = 1,5$ g/L) e capacidade de inibição de radicais peróxido ($EC_{50} = 1,0$ g/L) foi verificada para o extrato hidroalcoólico. No entanto, o melhor valor de FRAP (307,3 μ mol [ESF]/g) foi obtido no extrato aquoso. Verificou-se que a citotoxicidade dos extratos varia com o solvente e a concentração utilizados. No entanto, de uma forma geral, até à concentração de 1 g/L, o extrato não apresenta toxicidade. Não foi registada atividade antimicrobiana para os isolados testados (*A. baumannii*, *B. cereus*, *B. safensis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *E. faecium*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. innocua*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*).

Embora as pétalas de *Crocus sativus* L. se tenham mostrado uma matriz promissora, o estudo descrito contém apenas parte dos ensaios efetuados, estando ainda alguns a decorrer. Este trabalho constituiu um ponto de partida para a possível valorização de um subproduto da produção da especiaria açafrão.

Palavras-Chave: *Crocus sativus* L., pétalas, extratos, sustentabilidade, compostos bioativos.

Abstract

Sustainability is a challenge that society has to overcome. Inside food scope and centred in that policy, the necessity to produce food for the planet's growing population without destroying resources imposes. As such, residues reutilization and by-products valorisation must be today's focus. In response, this work pretend to add value to *Crocus sativus* L. petals, a by-product of saffron production, the world most expensive spice.

In a first study, 3 extracts (aqueous, ethanolic, hidroethanolic) were obtained. The extract choice was based in total phenolic compounds. It was also made a compositional screening, whereupon alkaloids, phenolics, flavonoids, sugars, reducing sugars, tannins and terpenoids were surveyed. Only alkaloids and reducing sugars weren't detected.

Total content of anthocyanin's, phenolic compounds, flavonoids and tannins were quantified in the chosen extract (hidroethanolic (1:1), 1 g/L, 1h, 40 °C). Additionally, antioxidant activity was determined using DPPH, β -carotene bleaching and FRAP assays. Afterwards, cytotoxicity and antimicrobial activity was tested.

To the mentioned extract, values of total anthocyanin's (56.6 mg [CE]/g), total phenolic compounds (41.6 mg [GAE]/g), total flavonoids (19.0 mg [CE]/g) and total tannins (4.8 mg [TAE]/100g), were obtained.

Hidroethanolic extract exhibited the best DPPH• caption capacity (EC_{50} = 1.5 g/L) and peroxile radicals inhibition (EC_{50} = 1.0 g/L). However, the best FRAP value (307.3 μ mol [FSE]/g) was obtained for the aqueous extract.

It was observed that extract cytotoxicity varies with the solvent and concentration applied. However, in general, up to 1 g/L the extract doesn't exhibit cytotoxic effects. It wasn't recorded antimicrobial activity for the tested isolates (*A. baumannii*, *B. cereus*, *B. safensis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *E. faecium*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pnemoneae*, *L. inocua*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*).

Although *Crocus sativus* L. petals revealed a promising matrix, the described study contains only part of the performed assays, being others elapsing. This work constitutes the base for a possible valorisation of one by-product saffron production.

Keywords: *Crocus sativus* L., petals, extracts, sustainability, bioactive compounds.

Índice

Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas	xv
Revisão da Literatura	1
<i>Sustentabilidade e Valorização de Subprodutos</i>	<i>3</i>
<i>Especiarias</i>	<i>6</i>
<i>Crocus sativus L.</i>	<i>7</i>
<i>Pétalas da flor de Açafrão</i>	<i>12</i>
<i>Atividade Antioxidante</i>	<i>14</i>
DPPH	15
FRAP	15
<i>β-Carotene Bleaching</i>	<i>16</i>
<i>Atividade Antimicrobiana</i>	<i>16</i>
<i>Citotoxicidade</i>	<i>17</i>
Material e Métodos	21
<i>Amostragem</i>	<i>23</i>
<i>Reagentes e Padrões</i>	<i>24</i>
<i>Equipamentos</i>	<i>25</i>
<i>Preparação de Extratos de Pétalas de Flor de Açafrão</i>	<i>26</i>
Liofilização	26
<i>Determinação dos Compostos Bioativos</i>	<i>27</i>
Análise qualitativa	27
Compostos Fenólicos Totais	28
Flavonoides Totais	29
Taninos Totais	29
Antocianinas	30
<i>Atividade Antioxidante</i>	<i>31</i>
DPPH	31
<i>β-carotene bleaching</i>	<i>32</i>
FRAP	33
<i>Atividade Antimicrobiana</i>	<i>34</i>

<i>Citotoxicidade</i>	36
Tratamento das células	36
Viabilidade celular pelo ensaio MTT	36
Morte Celular pelo ensaio LDH.....	37
Proliferação Celular	37
Resultados e Discussão	39
<i>Método de Extração</i>	41
<i>Determinação de Compostos Bioativos</i>	43
<i>Atividade Antioxidante</i>	45
DPPH	45
β -carotene Bleaching.....	47
FRAP	49
<i>Atividade Antimicrobiana</i>	51
<i>Citotoxicidade</i>	54
Extrato Aquoso	54
Extrato Hidroalcoólico.....	56
Extrato Etanólico.....	58
Conclusão	61
Referências Bibliográficas	65

Índice de Figuras

Figura 1. Interligação esquemática das áreas envolvidas no desenvolvimento sustentável.	4
Figura 2. <i>Crocus sativus</i> (Planta).	7
Figura 3. Esquema da reação enzimática que ocorre no ensaio <i>LDH</i> (Retirada de <i>Cytotoxicity Detection Kit (LDH)</i> (Roche, Alemanha))	18
Figura 4. <i>Crocus sativus</i> L. selvagem, no local da colheita.	23
Figura 5. Pétalas (roxas), estames (amarelos) e estigmas (vermelhos) das flores de <i>Crocus sativus</i> L. selvagem.	23
Figura 6. Extração em placa sem ou com aquecimento (40 °C) com agitação magnética (660 rpm)	26
Figura 7. Curva de calibração de Ácido Gálico obtida por leitor de microplacas (<i>BioTek Synergy HT</i> , GENS5), utilizada para determinar os compostos fenólicos totais dos extratos.	28
Figura 8. Curva de calibração de Catequina, utilizada para determinar os Flavonoides Totais dos extratos.	29
Figura 9. Curva de calibração de Ácido Tânico, utilizada para determinar os Taninos Totais dos extratos.	30
Figura 10. Curva de calibração de Trolox, utilizada para determinar a capacidade de neutralização de radicais livres (DPPH•) dos extratos.	32
Figura 11. Curva de calibração utilizada para determinar a poder antioxidante por redução do ião férrico (FRAP) dos extratos.	34
Figura 12. Teor de Compostos Fenólicos Totais dos extratos obtidos com diferentes concentrações (5; 2,5; 1,66; 1), solventes (água, álcool, mistura 1:1 água álcool), temperaturas (temperatura ambiente e 40°C) e tempos de extração (1, 2 ou 3h). [T: Temperatura (40°C); EAG: Equivalentes de Ácido Gálico].	42
Figura 13. Percentagem de inibição do radical DPPH• relativamente a diferentes concentrações de extratos de pétalas de <i>Crocus sativus</i> .	46
Figura 14. Percentagem de inibição de <i>β-carotene bleaching</i> relativamente a diferentes concentrações de extratos polares de pétalas de <i>Crocus sativus</i> .	48
Figura 15. Poder Férrico Redutor expresso em μM [ESF] relativamente a diferentes concentrações de extratos de pétalas de <i>Crocus sativus</i> . [ESF: Equivalentes de Sulfato Ferroso].	50

Figura 16. Poder Férrio Redutor expresso em μmol [ESF]/g relativamente a diferentes concentrações de extratos de pétalas de <i>Crocus sativus</i> . [ESF: Equivalentes de Sulfato Ferroso]	50
Figura 17. Avaliação do efeito de extrato aquoso de pétalas de <i>Crocus sativus</i> L. em isolados bacterianos representativos das diferentes espécies testadas.....	52
Figura 18. Avaliação do efeito de extrato etanólico de pétalas de <i>Crocus sativus</i> L. em isolados bacterianos representativos das diferentes espécies testadas.....	52
Figura 19. Avaliação do efeito de extrato hidroalcoólico de pétalas de <i>Crocus sativus</i> L. em isolados bacterianos representativos das diferentes espécies testadas.....	53
Figura 20. Viabilidade celular pelo ensaio MTT para o extrato aquoso de pétalas de açafrão após 1 e 24 horas de exposição.....	54
Figura 21. Proliferação celular após exposição do extrato aquoso de pétalas de açafrão durante 1 e 24 horas.....	55
Figura 22. Viabilidade celular pelo ensaio MTT para o extrato hidroalcoólico de pétalas de açafrão após 1 e 24 horas de exposição.....	56
Figura 23. Proliferação celular após exposição do extrato hidroalcoólico de pétalas de açafrão durante 1 e 24 horas.....	57
Figura 24. Viabilidade celular pelo ensaio MTT para o extrato etanólico de pétalas de açafrão após 1 e 24 horas de exposição.....	58
Figura 25. Proliferação celular após exposição do extrato etanólico de pétalas de açafrão durante 1 e 24 horas.....	59

Índice de Tabelas

Tabela 1. Principais compostos da planta <i>Crocus sativus</i> L. (Srivastava <i>et al.</i> , 2010).....	8
Tabela 2. Principais Funções Biológicas do Açafrão.....	9
Tabela 3. Trabalhos em Pétalas de Açafrão.....	13
Tabela 4. Isolados bacterianos utilizados para testar a capacidade antimicrobiana do extrato de pétalas de açafrão.	35
Tabela 5. Teor de Compostos Fenólicos Totais dos extratos obtidos com diferentes concentrações (5; 2,5; 1,66; 1), solventes (água, álcool, mistura 1:1 água álcool), temperaturas (temperatura ambiente e 40°C) e tempos de extração (1, 2 ou 3h). [EAG: Equivalentes de Ácido Gálico; DP: Desvio Padrão].	41
Tabela 6. Análise Qualitativa de alguns compostos.....	43
Tabela 7. Determinação de compostos bioativos utilizando um extrato 1 g/L [EtOH:H ₂ O (1:1), 40 °C 1h] (PS: Peso Seco).....	44
Tabela 8. Percentagem de inibição do radical DPPH• pelos diferentes extratos com diferentes concentrações de amostra.....	45
Tabela 9. Valores de EC ₅₀ para os ensaios DPPH• e β -caroteno para os diferentes extratos. Valores expressos em g/L.	46
Tabela 10. Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox.....	47
Tabela 11. Percentagem de inibição do ensaio β -carotene bleaching pelos diferentes extratos com diferentes concentrações de amostra.....	47
Tabela 12. Valores de EC ₅₀ para o ensaio β -caroteno para os diferentes extratos. Valores expressos em g/L.	48
Tabela 13. Poder antioxidante por redução do ião férrico (expresso em μ M [ESF]). (ESF: Equivalentes de Sulfato Ferroso)	49
Tabela 14. Poder antioxidante por redução do ião férrico (expresso em μ mol [ESF]/g PS). (ESF: Equivalentes de Sulfato Ferroso)	49

Lista de Abreviaturas

ATCC (*American Type Culture Collection*)
CMI (Concentração Mínima Inibitória)
DMSO (Dimetilsulfóxido)
DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo)
EAG (Equivalentes de Ácido Gálico)
EAT (Equivalentes de Ácido Tânico)
EC (Equivalentes de Catequina)
EC (Equivalentes de Cianidina)
EC₅₀ (*Half Maximal Effective Concentration*)
ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
ET (Equivalentes de Trolox)
GC-MS (Cromatografia Gasosa com detecção por Espectrometria de Massa)
HAT (Transferência de Átomos de Hidrogénio)
HO• (Radical Hidroxilo)
HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
ISO (*International Organization for Standardization*)
LDH (Lactato Desidrogenase)
LDL (*Low-density lipoprotein*)
MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
NADH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo)
PBS (*Phosphate buffered saline*)
RFC (Reagente de Folin-Ciocalteu)
SCAR's (Regiões Amplificadas Caracterizadas Sequencialmente)
TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*)
TBHQ (*tert-Butylhydroquinone*)
TLC (Cromatografia de Camada Fina)

Revisão da Literatura

Sustentabilidade e Valorização de Subprodutos

A dissertação que se apresenta e que se intitula “Pétalas da flor de açafrão (*Crocus sativus* L.): valorização de um subproduto” visa responder à necessidade crescente da sociedade de reutilização e valorização dos chamados “lixos” resultantes das diferentes indústrias da cadeia alimentar. Responde igualmente a uma linha de investigação que visa a valorização de diferentes produtos naturais por forma a evitar a utilização de alimentos ou seus derivados para outras aplicações que não alimentares.

Como tem sido amplamente divulgado, a produção de alimentos vai tornar-se escassa para alimentar os 9600 milhões de indivíduos em 2050. Garantir o aprovisionamento de alimentos a toda a população será um desafio global.

Torna-se evidente, portanto, a urgência em explorar de forma consciente os recursos naturais existentes e cruzar diferentes setores criando uma simbiose entre os mesmos. É necessário, assim, encontrar novas fontes sustentáveis e matérias-primas que, de alguma forma, correspondam às necessidades crescentes da população.

Entende-se por sustentabilidade a manutenção dos recursos atuais mantendo-os disponíveis para as gerações vindouras. Este postula um futuro desejável para as sociedades, no qual as condições de vida e o uso de recursos são o suficiente para suprimir as suas necessidades sem ultrapassar a sustentabilidade dos sistemas naturais e ambientais e, para que as gerações futuras possam alimentar as suas necessidades (Jollivet *et al.*, 1998). Obviamente que, para isto é necessário envolver toda a comunidade, indo muito mais longe do que apenas à questão ambiental, é preciso envolver as pessoas (vertente social e cultural), os dirigentes (vertente política) e é imprescindível, para financiar estes projetos, a vertente económica (Jollivet *et al.*, 1998; Pezon *et al.*, 2006).

Neste sentido, o desenvolvimento sustentável é o progresso humano mantendo intacto tudo o que está envolvente às comunidades.

O conceito de sustentabilidade é uma ideia complexa sendo um princípio organizado para a vida humana num planeta finito. No caso da sustentabilidade os temas principais são o ambiente, a vertente social e a economia (Fig. 1) (Lélé *et al.*, 1991; Pezon *et al.*, 2006).



Figura 1. Interligação esquemática das áreas envolvidas no desenvolvimento sustentável.

A sustentabilidade é uma ideia em constante evolução, uma vez que estão sempre a surgir novos desafios. Novos veículos, tecnologia mais avançada, necessidades energéticas mais elevadas, tratamento de resíduos em maior quantidade e de diferentes tipos, maior densidade populacional, desequilíbrio monetário, má distribuição populacional, escassez alimentar, aos quais o desenvolvimento sustentável tem de se adaptar e responder.

Historicamente podem considerar-se duas vertentes interligadas, a cronologia diretamente relacionada com a sustentabilidade e os acontecimentos paralelos que fazem surgir essa cronologia, sendo esse conjunto de acontecimentos a literal evolução da Humanidade.

Após a segunda guerra mundial, foram retomadas estratégias económicas que conduziram ao aumento populacional, com o consequente aumento do consumo energético, de combustíveis e de alimentos. Este consumismo desequilibrado, aquém das necessidades, e acima das possibilidades do planeta, fez surgir vários problemas e com estes, o conceito de desenvolvimento sustentável (Yosemite, 2014).

Ao longo das últimas décadas, vários acontecimentos marcaram a evolução do conceito de desenvolvimento sustentável.

Em 1968 o Clube de Roma reuniu individualidades de diferentes países (cientistas, alguns prêmios Nobel, economistas, políticos e dirigentes) com o objetivo de promover um crescimento económico sustentável (Kates *et al.*, 2001).

Em 1972, a conferência de Estocolmo sobre o Ambiente Humano foi a primeira Cimeira da Terra, na qual surgiram questões ambientais globais pertinentes, nomeadamente acerca das consequências da atividade humana na degradação do ambiente e no risco da própria espécie humana (Yosemite, 2014).

Em 1980, surge pela primeira vez o conceito de desenvolvimento sustentável no relatório “A Estratégia Global para a Conservação” da União Internacional para a Conservação da Natureza (“Union for the Conservation of Nature and Natural Resources”) (Yosemite, 2014).

Em 1987, o conceito de desenvolvimento sustentável foi, pela primeira vez, formalizado no Relatório de Brundtland e cuja definição se tornou das mais citadas:

“Desenvolvimento que satisfaz as necessidades do presente, sem comprometer a capacidade das gerações vindouras satisfazerem as suas próprias necessidades”

A partir desta data, decorreram a nível Mundial, várias conferências, cimeiras e tratados diretamente relacionados com a sustentabilidade económica, social e ambiental tornando este tema mais sensível, real, debatido e consciente.

A valorização de subprodutos, ou melhor, o maior aproveitamento possível das matérias-primas disponíveis é uma estratégia que se enquadra perfeitamente no conceito de desenvolvimento sustentável. As tendências atuais de produção alimentar levaram a um aumento da taxa de produção de subprodutos alimentares e desperdícios. A geração destes durante o processamento alimentar é inevitável e a quantidade e tipo de resíduos produzidos dificilmente pode ser alterada sem comprometer a qualidade do produto final (Spiertz *et al.*, 2010).

Numa política de sustentabilidade, muitas empresas alimentares, em vez de tratarem os subprodutos como desperdício transformam-nos em algo útil. A valorização, um conceito relativamente recente na gestão de resíduos, tem um potencial enorme para obter químicos, micronutrientes, enzimas e metabolitos preciosos, de elevado valor industrial *per si* ou após processos químicos e/ou biotecnológicos (Azapagic *et al.*, 2004).

A valorização dos subprodutos é importante para as empresas, pois na maior parte dos casos, tem benefícios económicos. Na vertente social, esta tarefa pode representar novos postos de trabalho para a população local. Por fim, há vantagens a nível ambiental, pois estes subprodutos, que anteriormente eram despejados em rios ou aterros, podem ser aplicados em novos produtos ou constituir um novo produto *per si*.

O objetivo da valorização de subprodutos da indústria alimentar é a mobilização de recursos, reciclagem e gestão de desperdícios, com o aproveitamento de fontes naturais não convencionais para uma valorização económica. Assegurando um ambiente saudável e contribuindo significativamente para a sustentabilidade ambiental, social e económica (Azapagic *et al.*, 2004)

Especiarias

As especiarias acompanharam o ser humano desde longa data. Não há um registo específico do início da sua utilização, no entanto sabe-se do seu uso na antiguidade. Parecem ter resistido ao tempo, pois a alimentação foi variando, mas as especiarias permaneceram as mesmas, desde a idade média até à atualidade (Brassfield *et al.*, 2008).

A indústria das especiarias evoluiu rapidamente nas últimas décadas, sendo atualmente avaliada em 3,2 milhões de dólares. O aumento da consciência global, e, principalmente por parte dos consumidores, da potencialidade das especiarias, do desenvolvimento de novos produtos, processos e aplicações contribuíram para que esta indústria escalasse novos e mais elevados patamares no mercado (Brassfield *et al.*, 2008).

A indústria das especiarias é regulada pela Organização Mundial de Especiarias (OME), uma organização sem fins lucrativos sediada em Koshi (capital das especiarias da Índia). Esta organização tem como objetivo primário facilitar a resolução de problemas relacionados com “Sustentabilidade e Segurança Alimentar”. A OME procura atingir os seus objetivos envolvendo todas as partes interessadas – o público em geral, a indústria, a universidade e os utilizadores finais (WSO, 2014).

A OME reconhece que os maiores problemas que afetam a indústria atualmente são a baixa produtividade e a ocorrência de químicos prejudiciais e que esses têm origem no local de produção. Reconhece ainda que são necessários esforços para a sustentabilidade do sector e a segurança alimentar a esse nível, sendo um exemplo o aproveitamento dos subprodutos (WSO, 2014).

A indústria global das especiarias tem crescido de modo estável nos últimos anos e as especiarias têm sido usadas em novas aplicações ao nível da alimentação, da cosmética e dos nutracêuticos. Por trás de todo este cenário de crescimento encontra-se a OME, com o objetivo de disponibilizar especiarias seguras e conservar as ervas e seus derivados para as gerações atuais e futuras, através de um desenvolvimento sustentável (WSO, 2014).

Sendo a produção sustentável parte integrante dos princípios da OME, será mais fácil a utilização de subprodutos criados aquando da produção de especiarias. São apenas necessários estudos acerca dos subprodutos de modo a conhecer a sua aplicabilidade e o rendimento, que no caso da produção familiar tem grande importância como é o caso do açafrão (*Crocus sativus* L.).

***Crocus sativus* L.**

O *Crocus sativus* L. (Fig. 2), uma planta herbácea perene, pertencente à família *Iridaceae*. A planta mede entre 10 a 25 cm e é muito pouco exigente nas condições de crescimento. Suportando temperaturas extremas (40 °C no verão e -15 °C no Inverno) (Kafi *et al.*, 2006).



Figura 2. *Crocus sativus* (Planta).

Existem diferentes teorias sobre a origem desta planta, mas o mais provável é que seja originária do Irão, nomeadamente das montanhas Zagross e Alvand (Kafi *et al.*, 2006; Vijaya *et al.*, 2011)

Atualmente, é cultivado no Irão, Índia (Kashmir), Tibete e no sul da Europa (Grécia [Kozani], Espanha [La Mancha] e Itália [Sardenha, Abruzzo, Sicília, Toscana e Ombrie]) (Halvorson *et al.*, 2008; Saima *et al.*, 2009)

A especiaria açafrão é constituída pelos estigmas dessecados das flores da planta *Crocus sativus* L. inteiros ou moídos. Cada flor apresenta apenas um estigma, dividido em três filamentos vermelhos/laranjas, unidos por uma porção de estigma amarela. A palavra açafrão, é oriunda do latim *safranum*, que por sua vez, provém da palavra árabe *asfar*, que significa amarelo. São produzidos anualmente aproximadamente 350kg, 1057kg e 5300kg de açafrão pela Itália, Espanha e Grécia respetivamente (Saima *et al.*, 2009).

O ciclo vegetativo do *Crocus sativus* L. divide-se em dois estados, ativo e repouso. No estado ativo a planta reinicia a sua atividade metabólica, com o aparecimento de flores, e onde ocorre o enraizamento, o brotamento e a folheação. Por volta de Agosto ou Setembro surgem as flores vermelhas, roxas ou brancas, acompanhadas dos estigmas em Novembro. No estado de repouso ocorrem as fases de dormência e maturação (Kafi *et al.*, 2006)

Na maior parte dos locais onde o *Crocus sativus* L. é cultivado, os estigmas são separados das flores manualmente, embora já existam mecanismos semiautomáticos como a oscilação e túneis de vento para efetuar esta tarefa (Babaie *et al.*, 2012). No

entanto, nesses locais, parte dos estigmas são separados manualmente, especialmente aqueles que se destinam à produção de açafrão de qualidade superior (Babaie *et al.*, 2012). O elevado custo do açafrão é explicado pelo tempo e cuidado necessários para produzir 1 kg, sendo necessárias 165000 flores. De uma forma geral, 1 kg de flores produz 72 g de estigmas frescos e 55 g de estigmas secos (Saima *et al.*, 2009).

O açafrão tem, indiscutivelmente, um papel especial na gastronomia, tendo marcado pratos que sem ele não teriam nem a mesma cor, nem o mesmo sabor. Além do seu uso na gastronomia, o açafrão é também utilizado, desde a antiguidade, na medicina tradicional, na forma de extratos, graças às suas propriedades farmacológicas, que têm sido frequentemente postas em causa e, consecutivamente, comprovadas por grupos de investigação científica. (Kafi *et al.*, 2006; Saima *et al.*, 2009; Bathaie *et al.*, 2010).

Composição Química

O óleo essencial do açafrão representa apenas 0,3% do estigma. Nessa fração é possível encontrar cerca de 150 compostos dos quais 40 – 50 foram já identificados. Esses compostos funcionam como uma harmonia, ou seja, isoladamente podem não ter o mesmo efeito ou propriedade que apresentam quando em conjunto, atuando, por isso, sinergicamente (Rios *et al.*, 1996; Bathaie *et al.*, 2010).

A análise de diferentes partes da planta revelou os seus principais componentes como sendo hidratos de carbono, água, polipéptidos, celulose, lípidos, minerais e compostos não azotados (tabela 1) (Srivastava *et al.*, 2010).

Tabela 1. Principais compostos da planta *Crocus sativus* L. (Srivastava *et al.*, 2010).

Composto	Quantidade Aproximada (%)
Compostos Não Azotados	40,0
Água	19,0
Hidratos de Carbono	15,0
Polipéptidos	14,0
Celulose	7,0
Lípidos	8,0
Minerais	1,5

Os principais componentes dos estigmas são a crocetina, a picrocrocina e o safranal (Hasan *et al.*, 2011). Os ésteres de crocetina, pertencentes ao grupo dos carotenoides, são responsáveis pela cor, a picrocrocina pelo sabor e o safranal pelo aroma (Saima *et*

al., 2009). No entanto, além da cor, do sabor e do aroma, estes componentes conferem outras potencialidades farmacológicas ao açafrão (tabela 2) (Bathaie *et al.*, 2010; Vijaya *et al.*, 2011; Hasan *et al.*, 2011). É de salientar que apenas 0,3% conferem as mais importantes propriedades do açafrão.

Tabela 2. Principais Funções Biológicas do Açafrão.

Efeitos na Saúde	Constituintes testados	Modelo	Observações	Referência
Desordens gástricas	Extrato etanólico de açafrão	Ratos <i>Winstar</i> adultos	25, 100 ou 250 mg/kg preveniram lesões gástricas	Melnyk <i>et al.</i> , 2010
Promotor da digestão	Extrato aquoso de açafrão	Ratos <i>Winstar</i>	100 mg/kg aumentaram a produção de enzimas gástricas	Melnyk <i>et al.</i> , 2010
Funções anticancerígenas	Extrato etanólico de açafrão	Células HeLa e HepG2	O IC50 do extrato contra as células HeLa e HepG2 foi 800 µg/mL e 950 µg/mL respectivamente	Tavakkol <i>et al.</i> , 2008
	Safranal e Picrocrocina	Células HeLa	IC50 do safranal e da picrocrocina foi de 0,8 mM e 3 mM, respectivamente	Abdullaev <i>et al.</i> , 2003
Inibição tumoral	Crócina	Tumor no cólon implantado em Murganhos	Efeito significativo nas fêmeas a concentrações de 400 mg/kg de massa corporal	Garcia-Olmo <i>et al.</i> , 1999
Efeitos hipnóticos e ansiolíticos	Extrato aquoso de açafrão, safranal e crócina	Murganhos	O extrato aquoso de açafrão (0,56 g/kg) e o de safranal (0,35 mL/kg) causaram efeitos hipnóticos e ansiolíticos. A crócina apenas apresentou tais efeitos a uma concentração de 50 mg/kg	Pitsikas <i>et al.</i> , 2008
Efeito antiaterogénico	Crócina	Murganhos	25 a 100 mg/kg/dia durante 10 dias reduziram o nível de triglicerídeos e de colesterol LDL	Sheng <i>et al.</i> , 2006

Da flor à especiaria

O açafrão sofre várias etapas desde o campo até às prateleiras das superfícies comerciais.

Após serem colhidas, as flores são transportadas até ao local onde se removem os estigmas e deixadas fora as restantes partes. Este processo é quase sempre efetuado manualmente.

Os estigmas são de seguida desidratados. Cada região de produção utiliza uma metodologia diferente para o efeito. Em Itália, os estigmas são envolvidos em azeite antes da desidratação realizada em secadores elétricos, a uma temperatura constante de cerca de 45 °C. Na Grécia, os estigmas são dispostos em camadas finas dentro de quartos com a temperatura controlada entre os 25 e os 30 °C, durante 12 ou 24 horas. Em Espanha, a desidratação ocorre em peneiros metálicos, onde os estigmas são dispostos em camadas, e aquecidos a temperaturas acima dos 70 °C durante 30 minutos. Independentemente do processo, a desidratação leva perdas de cerca de 20% do peso dos estigmas. Uma desidratação exagerada reduz a qualidade do açafrão além de diminuir o rendimento de uma colheita. Por fim ocorre uma inspeção e limpeza manual antes de ser embalado, geralmente em boiões de vidro (Melnyk *et al.*, 2010).

Todas estas etapas têm de ocorrer no dia em que as flores são colhidas, uma vez que a especiaria perde qualidade com a exposição ao ar (Melnyk *et al.*, 2010).

O açafrão de qualidade superior é vendido inteiro (filamentos) em boiões herméticos, opacos, uma vez que a especiaria se degrada com a luz e/ou agentes oxidantes (oxigénio do ar) (Melnyk *et al.*, 2010).

Controlo da Qualidade do Açafrão

Um dos primeiros códigos de autenticidade surgiu no século 14 e foi criado precisamente para controlar a autenticidade do açafrão. Esse código denominava-se *safronschou code* e a sua existência deveu-se ao valor da especiaria e às inúmeras adulterações realizadas nessa altura. Este código estabelecia especificações padrão do açafrão e as penalidades para quem o adulterasse, sendo a pena de morte umas delas (Melnyk *et al.*, 2010)

Atualmente existe uma legislação que regulamenta o controlo da qualidade das especiarias de uma forma geral, a ISO/TC 34/SC 7 Especiarias e Ervas com Fim Culinário. Esta norma refere-se aos requisitos necessários para obtenção e manutenção das especiarias e às metodologias para o seu controlo da qualidade. Relativamente a

esta norma, 19 são participantes, sendo que, desses apenas 6 países Europeus estão envolvidos dentro dos quais se encontra Portugal (ISO 3632-1/2, Geneva, 2003).

Para além desta norma geral, existe ainda uma norma específica para o açafrão, a ISO 3632:2003, que se divide em duas partes, a ISO 3632-1 e a ISO 3632-2.

A ISO 3632-1 estabelece as especificações para se obter o açafrão a partir das flores de *Crocus sativus* L., quer em filamentos, quer em pó.

A ISO 3632-2 especifica métodos para a análise do açafrão para o controlo da sua qualidade.

A qualidade do açafrão é determinada por critérios próprios da espécie (parâmetros intrínsecos) e por critérios exógenos (parâmetros extrínsecos). (Kafi *et al.*, 2006).

Como parâmetros intrínsecos (físicos e químicos) consideram-se a humidade, resíduos presentes na flor ou outros resíduos, cheiro, sabor e intensidade da cor. A sua determinação é variável consoante a região de produção. Na Sardenha, por exemplo, é utilizado o método industrial farmacêutico Europeu, enquanto que, em Espanha e na Grécia se utilizam os métodos definidos na norma ISO/TS 3632.

Em Espanha, além dessa legislação, é seguida outra regulamentação que assegura a qualidade do açafrão designado por “Azafrán de la Mancha”.

Para determinar as características organolépticas são usadas análises sensoriais para avaliar a aparência, cheiro/sabor e textura, que também variam conforme a região. Em algumas regiões, essas análises permitem selecionar o açafrão de melhor qualidade.

Os parâmetros extrínsecos têm como objetivo avaliar possíveis adulterações, garantir a segurança microbiológica e níveis adequados/aceitáveis de resíduos de pesticidas.

Para avaliar adulterações utilizam-se técnicas como TLC, HPLC e análise microscópica. Tal como todas as especiarias, o açafrão não deve conter qualquer tipo de adulteração, nomeadamente a presença de óleos, melado ou substâncias metálicas que aumentem o seu peso ou corantes que melhorem a sua aparência. A técnica de TLC tem um baixo custo, sendo usada em grande escala; se algo for detetado por esta técnica utiliza-se HPLC para confirmar e quantificar. A técnica de HPLC é especialmente utilizada para identificar possíveis corantes.

A segurança microbiológica é regulada segundo legislação própria de cada país. De uma forma geral, pesquisa-se a presença de microrganismos coliformes e fermentativos. Se presentes procede-se à sua quantificação.

Também é efetuada uma análise a resíduos de pesticidas com recurso à técnica de GC-MS.

A inovação no controlo da qualidade do açafrão é uma realidade, desde marcadores moleculares a marcadores químicos, a comunidade científica tem mostrado interesse em inovar e melhorar as técnicas já existentes.

A detecção rápida de safranal por UV-Vis, métodos de extração de safranal e de picrocrocina mais robustos, sensíveis e precisos e o desenvolvimento de marcadores moleculares como SCAR são exemplos do referido (Zougagh *et al.*, 2005; Zougagh *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2009; Maggi *et al.*, 2011; Torelli *et al.*, 2014).

Pétalas da flor de Açafrão

Têm sido desenvolvidos alguns trabalhos com pétalas de açafrão (tabelas 3) em resposta à necessidade de valorização de subprodutos de variadas origens. Há atualmente a sensibilização da sociedade, mas para tal é preciso ter conhecimento, principalmente ao nível da toxicidade.

Os diferentes trabalhos têm como objetivo comum aumentar o conhecimento sobre o aproveitamento de um potencial subproduto.

De acordo com a tabela 3 foram efetuados trabalhos em pétalas de açafrão originárias de diferentes países (Itália, Espanha, França e Irão) usando diferentes extratos e metodologias.

Foram identificados, entre outros compostos, flavonoides e antocianinas.

Verifica-se que os extratos avaliados usaram metanol e metanol/água, composição que impede a sua utilização na indústria alimentar, farmacêutica e de cosméticos. Em 3 outros trabalhos da tabela 3 foram usados extratos aquoso, aquoso acidificado, hidroalcoólico, hidroalcoólico acidificado permitindo a sua utilização em aplicações na indústria alimentar, medicinal e cosmética.

Para a avaliação do valor destes extratos, a nível de antioxidantes é vulgar determinar a atividade antioxidante, entre outros parâmetros. Para a possível utilização como conservante é frequente o estudo da atividade antimicrobiana dos extratos. A sua possível utilização só fica finalmente continuada após estudos de toxicidade e verificação da sua ausência/presença em níveis aceitáveis. O trabalho efetuado pretende dar mais um passo no conhecimento deste produto, atualmente sem aplicação, mas com possível potencial dada a riqueza dos extratos.

Tabela 3. Trabalhos em Pétalas de Açafrão

Origem do <i>Crocus sativus</i>	Extração	Metodologias	Resultados Principais	Referência
Irão	EtOH:H ₂ O (8:2) Liofilizado	Ensaio clínico duplo-cego aleatório (6 Semanas)	2 Capsulas por dia, cada uma com 15 mg de liofilizado, apresentaram efeitos antidepressivos relativamente a um placebo de acordo com a escala de depressão de Hamilton	Moshiri <i>et al.</i> , 2006
Itália	Metanol	HPLC-UV LC-ESI-MS	Deteção de compostos flavonoides e não flavonoides (Kaempferol , Quercetina , Isorametina , Tamarixetina e derivados)	Montoro <i>et al.</i> , 2012
La Mancha	EtOH:H ₂ O:HCl (70:29:1)	TEAC (24h) Polifenóis Flavonoides Antocianinas	TEAC = 3,43 ± 1,1 mg [ET]/L Folin (pH 3,5) = 90,1 ± 0,4 mg [EK]/g PS Flavonoides = 63,9 ± 1,1 mg [EK]/g PS Antocianinas = 16.6 ± 0,1 mg [EM]/g PS	Serrano-Díaz <i>et al.</i> , 2012
França	Metanol:H ₂ O (1:1) com 1%HCl	HPLC	Antocianinas = 4804 ± 2,33 µg/g PS [Delfinidina (80%)] Flavonoides = 22.74 ± 2,29 µg/g PS [Kaempferol (84%)]	Goupy <i>et al.</i> , 2013
Espanha	---	Análise Nutricional	Proteínas = 8,17 ± 0,27 g/100g Lípidos = 2.22 ± 0,29 g/100g Cinzas Totais = 6,16 ± 0,05 g/100g Açúcares = 1.67 ± 0,02 g/100g Humidade = 10,76 ± 0,24 g/100g Fibra = 27,5 ± 0,10 g/100g Energia = 314,20 ± 2,22 Kcal/100g P = 0,232 ± 0,006 g/100g Mg = 0,098 ± 0,01 g/100g Ca = 0,125 ± 0,008 g/100g Fe = 0,028 ± 0,001 g/100g K = 1,353 ± 0,01 g/100g Na = 0,012 ± 0,001 g/100g	Serrano-Díaz <i>et al.</i> , 2013
Espanha	H ₂ O (W1) H ₂ O:HCl (W2) Etanol (E1) Etanol:HCl (E2) Diclorometano (D) Hexano (H)	Citotoxicidade [MTT] (Fibroblastos 3T3)	W1, W2, E1, E2 [0,9 µg/mL – 900 µg/mL]; D e H [0,4 µg/ml – 400 µg/ml]. Não apresentaram citotoxicidade para fibroblastos 3T3	Serrano-Díaz <i>et al.</i> , 2014

PS: Peso Seco;

ET: Equivalentes de Trolox; EK: Equivalentes de Kaempferol; EM: Equivalentes de Malvidina

Atividade Antioxidante

O estudo da atividade antioxidante é de grande importância, não apenas para as especiarias, mas, de uma forma generalizada, para os vários produtos naturais. Desde a prevenção de reações de oxidação em alimentos, medicamentos e cosméticos até ao papel das Espécies Reativas de Oxigénio (ROS) em doenças crónicas (cancro, doenças inflamatórias, autoimunes, cardiovasculares e neurodegenerativas), a atividade antioxidante é fundamental para retardar qualquer um dos processos (Magalhães *et al.*, 2008).

Há evidências *in vivo* que o consumo de certos alimentos leva à redução de biomarcadores de dano oxidativo e que, *in vitro*, muitos compostos ativos provenientes de alimentos apresentam uma elevada capacidade antioxidante, sendo exemplo o caso das especiarias (Hossain *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011).

Os antioxidantes podem ser agrupados em classes, dividindo-se em dois grandes grupos, enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos podem ser enzimas primárias (glutathione peroxidase, catalase) ou enzimas secundárias (glutathione reductase). Os antioxidantes não enzimáticos podem ser flavonoides, vitaminas, minerais, carotenoides, ácidos fenólicos, compostos organosulfurados ou compostos nitrogenados (Moon *et al.*, 2009).

Existem várias metodologias para avaliar a capacidade antioxidante *in vitro*, todas com vantagens e desvantagens e, como não existe um método universal, deverão ser utilizados vários, de forma a obterem-se resultados mais fiáveis (Moon *et al.*, 2009).

As metodologias de avaliação da atividade antioxidante dividem-se essencialmente em duas classes, transferência de átomos de hidrogénio (HAT) e transferência de eletrões (ET) (Prior *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2001; Moon *et al.*, 2009).

A transferência de átomos de hidrogénio avalia a capacidade de um antioxidante eliminar radicais livres através da cedência de átomos de hidrogénio. Neste tipo de ensaios verifica-se uma competição entre antioxidantes e substratos pelos radicais peróxido, sendo reações rápidas e independentes dos solventes e do pH (Phipps *et al.*, 2007; Zulueta *et al.*, 2009). A capacidade antioxidante expressa em equivalentes de trolox (TEAC), poder antioxidante por redução do ião férrico (FRAP) e a captação do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH•) são exemplos de ensaios nos quais se verifica a transferência de átomos de hidrogénio (Phipps *et al.*, 2007).

Pela transferência de eletrões é avaliado o potencial antioxidante por transferência de um eletrão de uma para outra espécie e concomitante redução da segunda. Estas reações, em oposição às de transferência de átomos de hidrogénio, são lentas e dependentes do

pH (Prior *et al.*, 2000; Phipps *et al.*, 2007). O parâmetro antioxidante de radicais totais (TRAP) e a capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) são exemplos de ensaios onde se verifica a transferência de elétrons (Phipps *et al.*, 2007).

DPPH

A capacidade de captação de DPPH• é um dos ensaios mais utilizados para determinar a atividade antioxidante em plantas (Ndhlala *et al.*, 2010).

Este método utiliza o radical de azoto DPPH•. A redução na concentração do DPPH•, durante a reação, é monitorizada por absorvência a um comprimento de onda característico. Na sua forma radicalar, o DPPH• absorve a 515 nm, mas após redução por um antioxidante, a absorção desaparece (Magalhães *et al.*, 2008).

O DPPH• é um radical estável, comercialmente disponível, tornando este método mais fácil e acessível.

FRAP

O FRAP é caracterizado pela redução do complexo férrico tripiridiltiazina ([Fe(III)-TPTZ]) ao estado ferroso tripiridiltiazina ([Fe(II)-TPTZ₂]) por um antioxidante, em meio ácido, geralmente a pH 3,6, de forma a manter a solubilidade do ferro (Magalhães *et al.*, 2008).

O poder redutor do composto antioxidante é medido por espectrofotometria a 593 nm. A redução do complexo férrico causa um aumento da absorvência devido à formação do complexo ferroso de cor azul intensa (Magalhães *et al.*, 2008).

Este método, embora rápido, simples e robusto, apresenta algumas limitações.

i) Qualquer composto que possua potencial redox irá reduzir o complexo férrico, mesmo que não possua atividade antioxidante e, nem todos os antioxidantes reduzem esse complexo. Neste último caso, poderão ser antioxidantes que não atuam a uma velocidade suficientemente rápida para a redução ser observada dentro dos limites de tempo estabelecidos por esta metodologia, ou antioxidantes cujo mecanismo não envolve reações redox, como tióis e carotenoides. ii) A produção simultânea de Fe(II), que é um conhecido prooxidante, pode resultar na produção adicional do radical HO• a partir de H₂O, um dos mais nocivos encontrados *in vivo*. iii) Compostos que absorvem no mesmo comprimento de onda poderão interferir na determinação, causando medições incorretas do valor de FRAP (Magalhães *et al.*, 2008).

β-Carotene Bleaching

O β-Caroteno é um potente antioxidante que reage com o radical peróxido produzindo epóxidos de caroteno (Moon *et al.*, 2009).

Devido a este facto, foi estabelecido um ensaio antioxidante que utiliza β-Caroteno e ácido linoleico. O ácido linoleico, na presença de ROS, forma um radical peroxilo que reage com o β-Caroteno o que, consequentemente, leva à diminuição deste na solução teste (Moon *et al.*, 2009).

Na presença de um antioxidante este reagirá competitivamente com o radical peróxido e dessa forma não haverá diminuição de β-Caroteno tão acentuada (Moon *et al.*, 2009).

Os efeitos antioxidantes de um determinado composto ou extrato podem ser monitorizados pelo “branqueamento” (*bleaching*) da cor da solução num espectrofotómetro a 470nm, que corresponde à absorvência típica do β-Caroteno (Moon *et al.*, 2009).

Atividade Antimicrobiana

Existe uma preocupação crescente da segurança alimentar, devido à ocorrência cada vez mais frequente de doenças de origem alimentar (DOA), principalmente as que são causadas por microrganismos patogénicos. Simultaneamente, há uma busca, cada vez mais exigente, da parte dos consumidores, por alimentos seguros e de elevada qualidade com o mínimo de aditivos artificiais e sintéticos. Por isso, o estudo da atividade antimicrobiana das especiarias ou seus subprodutos torna-se muito importante para a inovação alimentar, como vantagem competitiva e satisfação dos consumidores (Tajkarimi *et al.*, 2010).

Foi demonstrado que especiarias e ervas aromáticas que contenham óleos essenciais entre 0,05% e 0,1% apresentam atividade contra microrganismos patogénicos como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (Burt *et al.*, 2004).

Compostos com atividade antimicrobiana como glicosídeos, saponinas, taninos, alcaloides e/ou ácidos orgânicos estão presentes como sistema de defesa original de diferentes partes da planta como pétalas, flores, folhas, ramos, raízes, frutos, sementes ou rizomas (Periago *et al.*, 2006; Tajkarimi *et al.*, 2010).

A canela, cravinho, coentros e alho são exemplos de plantas/especiarias com elevada atividade antimicrobiana, em oposição à pimenta, gengibre e malagueta que possuem um nível inferior (Holley *et al.*, 2005).

A avaliação da atividade antimicrobiana é complexa e não é exata devido às diferentes variáveis como o método de extração, o meio de cultura, o tamanho do inóculo e do método utilizado. A atividade antimicrobiana é quantificada em concentração mínima inibitória (CMI) definida como a concentração mais baixa que inibe completamente o crescimento de um microrganismo em 48 horas de incubação (Tajkarimi *et al.*, 2010).

Como principais metodologias para avaliação da atividade antimicrobiana citam-se o método de difusão em disco, o método de difusão em agar e o método da microdiluição em caldo (Tajkarimi *et al.*, 2010).

Neste trabalho foi utilizado o método da microdiluição em caldo, uma metodologia que utiliza placas de *ELISA* estéreis, com 96 poços, cada um com um antimicrobiano diferente. Este método apresenta a vantagem de se poderem testar diferentes compostos ou o mesmo a concentrações graduais e diferentes microrganismos ao mesmo tempo.

Embora existam evidências da potencialidade antimicrobiana das especiarias, a sua aplicação é complicada devido à informação limitada acerca dos seus efeitos nos alimentos, ao seu odor forte e aos elevados custos (Tajkarimi *et al.*, 2010), o mesmo já não se aplica aos subprodutos, nomeadamente às pétalas de açafraão. Neste trabalho vai avaliar-se a atividade antimicrobiana de extratos deste subproduto.

Citotoxicidade

Conforme já referido, a citotoxicidade é uma propriedade importante dos extratos e que limita as suas possíveis utilizações.

Culturas celulares providenciam sistemas de acesso e de avaliação imediata de comportamentos de tecidos. O uso de linhas celulares é uma ferramenta valiosa para estudar problemas de relevância clínica, especialmente os relacionados com doenças, triagem e estudos de toxicidade (Allen *et al.*, 2005).

O acesso às células permite o estudo de mecanismos celulares que possam sugerir novos alvos farmacológicos e apresenta uma aplicação interessante na avaliação de agentes que possam tratar ou causar determinada disfunção celular (Allen *et al.*, 2005).

Neste trabalho, foram utilizados dois ensaios MTT e LDH.

O MTT, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, baseia-se na capacidade que as oxidoredutases celulares dependentes de NAD(P)H, presentes nas mitocôndrias, têm de reduzir este corante de tetrazólio à sua forma insolúvel, o formazan, que tem uma coloração púrpura (Mosmann *et al.* 1983). A quantidade de formazan produzido é diretamente proporcional ao número de células vivas (Vega *et al.* 2011). Quando as células morrem perdem a habilidade de formar formazan a partir do MTT portanto a

formação de cor trata-se de um marcador útil e conveniente apenas de células viáveis, sendo, por isso, um método colorimétrico sensível, quantitativo e robusto para a medição da viabilidade e/ou proliferação celular (Vega *et al.* 2011).

O método da viabilidade celular consiste em verificar as células vivas após a exposição durante um determinado período de tempo, a um determinado composto.

O método da proliferação celular serve para verificar se as células conseguem recuperar após exposição a um agente citotóxico durante um determinado período de tempo, a um determinado composto (Vega *et al.* 2011).

O princípio do ensaio LDH, baseia-se na morte celular através do rompimento da membrana celular (Holder *et al.* 2012). A LDH (lactato dihidrogenase) é uma enzima citoplasmática estável, presente em todas as células. Esta enzima é rapidamente libertada para o sobrenadante da cultura após dano da membrana plasmática (Holder *et al.* 2012). Com o uso de um *Kit* comercial, a atividade desta enzima pode ser facilmente quantificada com uma só medição a qualquer altura. O sobrenadante da cultura é recolhido sem nenhuma célula e incubado com a mistura de reação do *Kit*. A atividade da LDH é determinada num teste enzimático (Fig. 3). Se, no sobrenadante (sem células) existir *LDH* significa que a viabilidade membranar das células está comprometida, indicando morte celular (Lobner *et al.* 2000).

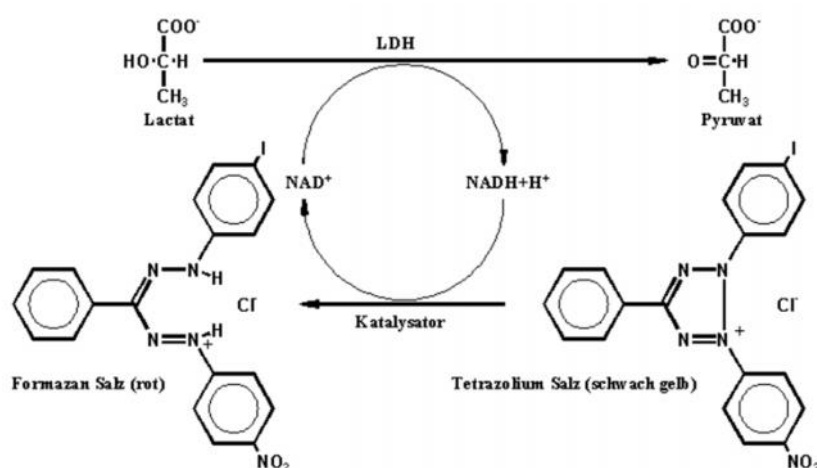


Figura 3. Esquema da reação enzimática que ocorre no ensaio *LDH* (Retirada de *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)* (Roche, Alemanha))

No primeiro passo deste protocolo, o NAD^+ é reduzido a $\text{NADH}+\text{H}^+$ pela conversão de lactato a piruvato, reação catalisada pela LDH. No segundo passo, o catalisador transfere H^+ do $\text{NADH}+\text{H}^+$ para o sal de tetrazólio (amarelo) que é reduzido a formazan (púrpura). Um aumento no número de células mortas corresponde a um aumento da atividade enzimática que, por sua vez, corresponde a um aumento de formazan formado. Portanto

a quantidade da cor vermelha formada, será proporcional à lise celular. O formazan apresenta uma absorção máxima a cerca de 500 nm, enquanto que o sal de tetrazólio não apresenta absorção significativa a este comprimento de onda (Holder *et al.* 2012).

Resumindo, o objetivo deste trabalho consistiu em obter diferentes extratos de pétalas de açafrão, proceder ao estudo do tipo de extrato com maior atividade antioxidante, tendo sempre em vista a sustentabilidade do processo de valorização deste subproduto, resultante da produção da especiaria mais cara (açafrão). Escolhido o extrato mais adequado procedeu-se à quantificação de alguns compostos bioativos (antocianinas, fenólicos, flavonoides, taninos), determinação da atividade antioxidante (DPPH, β -carotene bleaching e FRAP) e, posteriormente, determinada a citotoxicidade e a atividade antimicrobiana.

Material e Métodos

Amostragem

As amostras (flores de *Crocus sativus* L. selvagem) foram colhidas na região de Cinfães Norte (Fig. 4) entre as 14 e as 16 horas em finais de Novembro e início de Dezembro de 2013.

As amostras foram colhidas de forma a preservar ao máximo a integridade da flor, sem retirar o bolbo, evitando a degradação da flora natural da região.

As amostras representam *Crocus sativus* L. selvagem que cresce nas planícies de Cinfães sem tratamentos fitossanitários nem qualquer outro tipo de cuidado.

Após a colheita, as flores foram armazenadas em local fresco e arejado (tempo máximo de espera 15 h), procedendo-se o mais rapidamente possível à separação dos estames, estigmas e pétalas (Fig. 5).

As diferentes partes da flor foram congeladas a -20 °C e submetidas a -80 °C durante 20 minutos, antes da liofilização (48 horas). Após liofilização procedeu-se à moagem do produto.

A confirmação da identidade da espécie foi efetuada por um método de biologia molecular (Mafra *et al.*, 2008)



Figura 4. *Crocus sativus* L. selvagem, no local da colheita.



Figura 5. Pétalas (roxas), estames (amarelos) e estigmas (vermelhos) das flores de *Crocus sativus* L. selvagem.

Reagentes e Padrões

Acetato de sódio (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)
Ácido acético glacial (Chemlab, Bélgica)
Ácido gálico (SIGMA Chemical Co., China)
Ácido linoleico (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)
Ácido tânico (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)
 AlCl_3 (Cloreto de alumínio) (SIGMA Chemical Co., Alemanha)
Bismuth(III) subnitrate (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)
Catequina (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)
Clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha)
Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche, Alemanha)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Biochrom AG, Alemanha)
DMSO (Dimetilsulfóxido) (Merck, Darmstadt, Alemanha)
DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) (SIGMA Chemical Co., Alemanha)
Etanol absoluto (Panreac AppliChem, Barcelona)
FBS (Fetal bovine serum) (Gibco, Sul da América)
 FeCl_3 (Cloreto férrico) (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)
 H_2SO_4 (Ácido Sulfúrico)
HCl (Ácido Clorídrico)
KI (Iodeto de Potássio) (SIGMA Chemical Co., Alemanha)
L-Glutamina (Gibco, Reino Unido)
MEM [NEAA] (Minimum Essential Medium [Non-Essential Amino Acids]) (Gibco, Reino Unido)
Metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha)
MH (Mueller Hinton) (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)
MMS (Metanosulfonato de Metilo) (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)
MTT (Brometo de Tetrazólio) (SIGMA Chemical Co., Suíça)
NaCl (Cloreto de Sódio) (Merck, Darmstadt, Alemanha)
NaOH (Hidróxido de sódio) (Merck, Darmstadt, Alemanha)
 Na_2CO_3 (Carbonato de sódio) (Merck, Darmstadt, Alemanha)
 NaNO_2 (Nitrito de sódio) (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)
PBS (Phosphate Buffer Saline) (Lonza – Accugene, Bélgica)
Reagente Benedict (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)
Reagente Folin–Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Alemanha)
Sulfato ferroso (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)

TBHQ (tert-Butylhydroquinone) (Merck, Darmstadt, Alemanha)
TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina), (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)
Tripsina (Biochrom AG, Alemanha)
Triton x – 100 (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)
Trolox (SIGMA Chemical Co., Suíça)
Tween (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)
 α -naftol (SIGMA Chemical Co., Suíça)
 β -caroteno (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)

Equipamentos

Moinho (GM 200, RETSCH, Haan, Alemanha)
Placa de agitação (VARIOMAG, TELEMODUL 40 CT, H+P Labortechnik, Alemanha)
Vortex (VWR INTERNATIONAL, Darmstadt, Alemanha)
Espectrofotómetro (SHIMADZU, UV-1800)
Evaporador (Stuart – SBHCONC/1, Biocote)
Leitor microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT GENS5, USA)
Leitor microplacas (BioTek Instruments, Cambrex elx808, USA)
Liofilizador (Telstar – Cryodos, Espanha)
Câmara de Fluxo Laminar (ESI Flugrance, França)
Centrifuga (Heraeus Sepatech - Megafuge 1.0, Alemanha)
Incubadora (Binder, Alemanha)
Ultrasons (Sonorex – RK 100, Alemanha)
Microscópio Invertido (VWR INTERNATIONAL, Darmstadt, Alemanha)

Preparação de Extratos de Pétalas de Flor de Açafrão

Para o estudo da atividade antioxidante, antimicrobiana e citotoxicidade da matéria-prima em estudo (pétalas de flor de açafrão) prepararam-se extratos com diferentes solventes (água, álcool e mistura hidroalcoólica (1:1), v/v). Os solventes escolhidos respondem às questões de sustentabilidade (pouco agressivos para o ambiente e relativamente económicos) e podem ser utilizados em produtos alimentares.

Os extratos preparados usaram diferentes quantidades de amostra (5 g/L, 2,5 g/L, 1,66 g/L e 1 g/L) e foram obtidos recorrendo a placa de aquecimento com agitação constante (660 rpm), aquecida a 40 °C ou à temperatura ambiente (Fig. 6). O tempo de extração variou de 1h (40 °C) até 3h (temp. ambiente).

Os extratos obtidos foram filtrados e congelados a -25 °C até posterior análise. A preparação dos extratos seguiu o trabalho descrito por Costa et al., (2014).

A preparação de 3 extratos diferentes (aquoso, alcoólico e hidroalcoólico) visou encontrar as melhores condições de extração dos compostos com interesse para as atividades testadas (antioxidante e antimicrobiana) e também para avaliar o efeito na citotoxicidade.

Para comparar os diferentes extratos usou-se o método de Folin que avalia o teor de compostos fenólicos totais.



Figura 6. Extração em placa sem ou com aquecimento (40 °C) com agitação magnética (660 rpm)

Liofilização

Para os ensaios da atividade antioxidante, antibacteriana e citotóxica usaram-se os extratos (aquoso, etanólico e hidroalcoólico (1:1), v/v) com uma concentração de 1 g/L, obtidos nas condições de extração referidas (40 °C, 1h, 660 rpm) liofilizados.

Prepararam-se tubos (pesados rigorosamente) com 20 mL de extrato em cada.

O extrato aquoso foi congelado a -80 °C e liofilizado. O extrato etanólico foi evaporado com azoto à temperatura de 40 °C. O extrato hidroalcoólico foi parcialmente evaporado com azoto de seguida congelado a -80 °C e posteriormente liofilizado.

Os liofilizados foram pesados de modo a permitir determinar a produção dos diferentes extratos. A partir do produto liofilizado fizeram-se diferentes extratos de acordo com os protocolos dos diferentes ensaios a realizar.

Determinação dos Compostos Bioativos

Nos extratos procedeu-se à determinação dos compostos bioativos tendo sido determinados antocianinas, compostos fenólicos totais, flavonoides totais, os taninos totais.

Antes da quantificação procedeu-se à análise qualitativa dos extratos.

Análise qualitativa

A análise qualitativa incluiu a pesquisa de diferentes componentes usando métodos colorimétricos, segundo Sarma *et al.*, 2011 e Vinha *et al.*, 2012.

Para a determinação de açúcares foram adicionadas umas gotas de reagente de Molisch (α -naftol em etanol) e umas gotas de H₂SO₄ (10%) a 2 mL de extrato. A ocorrência de um anel roxo indica a presença de açúcares.

Para a determinação de açúcares redutores, foram adicionadas umas gotas de reagente de Benedict. A formação de um precipitado laranja avermelhado indica uma reação positiva.

Para a determinação de alcaloides foi adicionado 5 mL de HCl 1% a 2 mL de extrato. A mistura foi aquecida e filtrada. Adicionou-se umas gotas de reagente Dragendorff (1,7 g de *bismuth(III) subnitrate* e 100 mL de KI (50%) em 100 mL de mistura ácido acético glacial:água (1:4)) a 1 mL do filtrado. Uma reação positiva é indicada pela presença de precipitação e turbidez.

Para a determinação de compostos fenólicos, a 3 mL de extrato foi adicionado 1 mL de solução de NaCl (10%). A ocorrência da cor creme indica uma reação positiva.

Para a determinação de flavonoides foi adicionado 2 mL de metanol a 2 mL de extrato. Após 5 minutos de aquecimento, foram adicionadas umas gotas de HCl (36%). A ocorrência de coloração laranja/vermelha indica a presença de flavonoides.

Para a determinação de taninos foi adicionado 1 mL de FeCl (0,1%) a 2 mL de extrato. A formação de coloração azul ou verde indica a presença de taninos.

Para a determinação de terpenóides foi adicionado 3 mL de H₂SO₄ (10%) a 2 mL de extrato. A mistura foi aquecida durante 5 minutos em placa de aquecimento. Após aquecimento, a ocorrência de coloração vermelha/castanha indica a presença de terpenóides.

Compostos Fenólicos Totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos aquosos foi efetuada por um método espectrofotométrico, utilizando o reagente *Folin–Ciocalteu* (RFC), segundo metodologia previamente descrita (Alves *et al.*, 2010). Para elaborar a curva de calibração utilizou-se um padrão de ácido gálico com as concentrações 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L (Fig. 7).

Colocou-se 500 µL de extrato num tubo de ensaio adicionando 2,5 mL de RFC diluído em água desionizada (1:10). Adicionou-se 2,0 mL de Na₂CO₃ (7,5%) para alcalinizar a solução e colocou-se em banho-maria a 45 °C durante 15 minutos ao abrigo da luz.

Deixou-se em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos. Efetuaram-se as leituras espectrofotometricamente (λ = 765 nm) em leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT GENS5, USA).

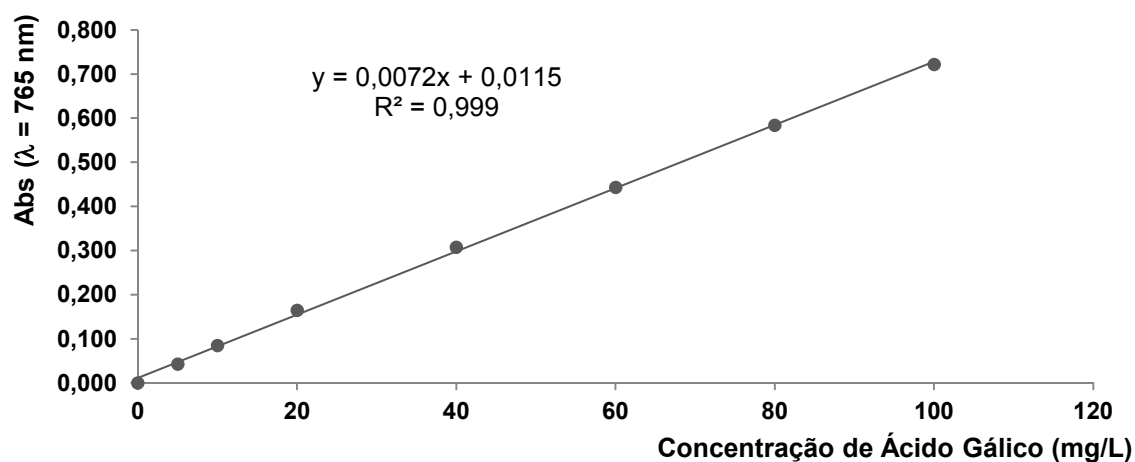


Figura 7. Curva de calibração de Ácido Gálico obtida por leitor de microplacas (BioTek Synergy HT, GENS5), utilizada para determinar os compostos fenólicos totais dos extratos.

Flavonoides Totais

Os flavonoides totais foram determinados por um método espectrofotométrico seguindo uma metodologia previamente descrita (Alves *et al.*, 2010) com ligeiras modificações. A técnica envolveu a medida da absorvência, a 510 nm, do complexo AlCl_3 -flavonoide, utilizando a reta de calibração de catequina com as concentrações 2,5, 5, 7,5, 10, 25, 50, 100 e 200 mg/L (Fig. 8), efetuada aquando das determinações.

Num tubo de ensaio colocou-se 1 mL de extrato, 4 mL de água destilada e 300 μL de NaNO_2 a 25%. Após 5 minutos adicionaram-se 300 μL de AlCl_3 a 10% e aguardou-se 1 minuto. Adicionaram-se 2 mL de solução de NaOH 1 mol/L e 2,4 mL de água destilada. Agitou-se em vortex e efetuaram-se as leituras espectrofotometricamente ($\lambda = 510 \text{ nm}$) em leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT GENS5, USA).

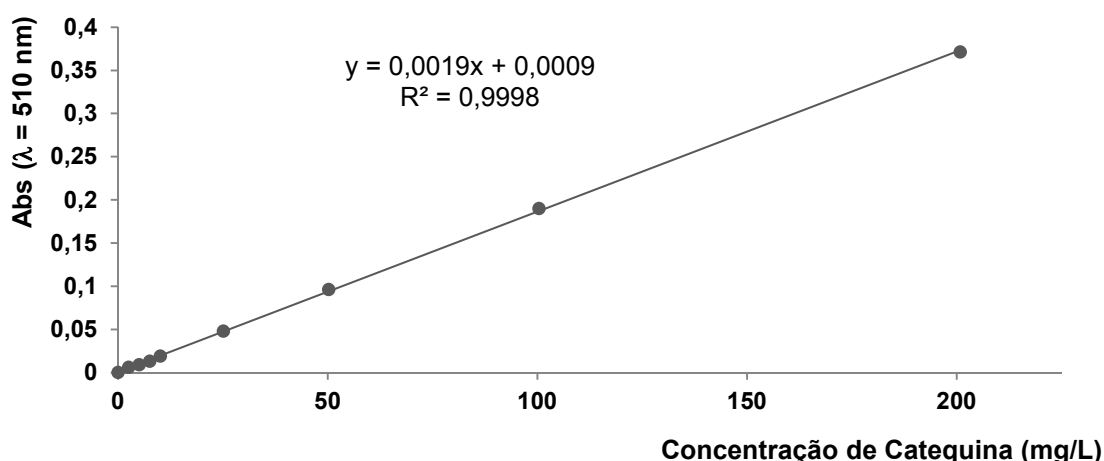


Figura 8. Curva de calibração de Catequina, utilizada para determinar os Flavonoides Totais dos extratos.

Taninos Totais

Para a determinação dos taninos totais utilizou-se o RFC, segundo metodologia previamente descrita (Costa *et al.*, 2014) com ligeiras modificações, utilizou-se a curva de calibração de ácido tânico com concentrações desde 0,002 a 0,15 mg/L (Fig. 9), elaborada aquando dos ensaios.

A 500 μL de amostra foram adicionados 2,5 mL de reagente RFC (1:10). Agitou-se vigorosamente e após 3 minutos foram adicionados 2 mL de solução de Na_2CO_3 e deixou-se repousar durante 2 horas ao abrigo da luz.

As leituras foram efetuadas espectrofotometricamente ($\lambda = 725 \text{ nm}$) em leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT GENS5, USA).

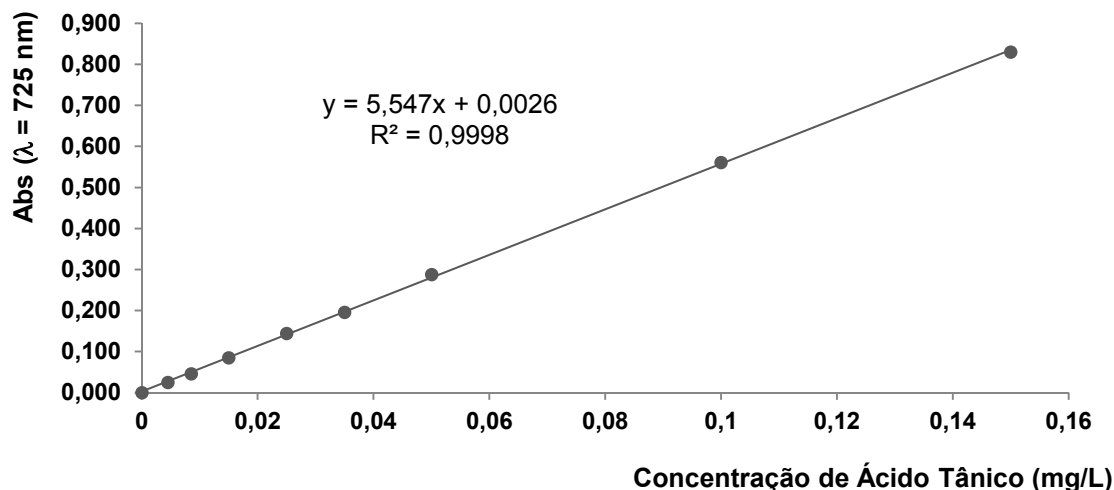


Figura 9. Curva de calibração de Ácido Tânico, utilizada para determinar os Taninos Totais dos extratos.

Antocianinas

As antocianinas totais foram determinadas por um método espectrofotométrico seguindo a metodologia descrito por Tsai *et al.*, (2002), com ligeiras modificações. A técnica envolveu a medida da absorvência ($\lambda = 528 \text{ nm}$) das antocianinas em meio ácido, utilizando o coeficiente de extinção molar da cianidina.

Num tubo de ensaio colocou-se 1 mL de extrato e 6 mL de metanol com 0,1% de HCl. Agitou-se em vortex e efetuaram-se as leituras espectrofotometricamente ($\lambda = 528 \text{ nm}$) em leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT GENS5, USA).

Para o cálculo das antocianinas utilizou-se a equação (1).

$$(1) \text{ Antocianinas (mg [Equivalentes de Cianidina])/L} = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon_c \times 1}$$

Onde A é a absorvência, MW é a massa molecular, DF é o fator de diluição e ϵ_c é o coeficiente de extinção molar da cianidina.

Atividade Antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante foram realizados três ensaios, segundo metodologias previamente descritas:

- Determinação da capacidade de neutralização do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo DPPH• (Barreira *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2014);
- *β-carotene Bleaching* (Barreira *et al.*, 2008);
- Avaliação do poder antioxidante por redução do ião férrico (FRAP) (Benzie e Strain, 1996).

DPPH

O ensaio DPPH foi utilizado para o cálculo dos valores de EC₅₀ dos três extratos (etanólico, hidroalcoólico e aquoso) e a capacidade de neutralizar radicais DPPH• expresso em equivalentes de trolox.

Efetuar-se algumas alterações ao método descrito por Barreira *et al.*, (2008). O método consistiu em adicionar a 30 µL de cada extrato a diferentes concentrações, 270 µL de solução etanólica de DPPH• (6,0 x 10⁻⁵ mol/L), foi utilizado etanol absoluto como branco e 300 µL de solução etanólica de DPPH• (6,0 x 10⁻⁵ mol/L) para o cálculo das percentagens de inibição, agitar e efetuar as leituras, de 2 em 2 minutos, espectrofotometricamente (λ = 525 nm) em leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT GENS5, USA), até a reação estabilizar. Baixos valores de absorvência indicam maior capacidade de neutralizar radicais livres. As percentagens de inibição e valores de EC₅₀ foram calculados com as equações (2) e (3).

Foi utilizada a equação (2) para o cálculo das percentagens de inibição.

$$(2) \text{ Inibição (\%)} = \frac{(A_D - A_A)}{A_D} \times 100,$$

Onde A_D é a absorvência do DPPH• e A_A a absorvência da amostra.

Com os valores das percentagens de inibição para as diferentes concentrações foi utilizada a equação (3) para calcular os valores de EC₅₀ para cada extrato. Foram utilizados os valores de percentagem de inibição no intervalo entre duas concentrações no qual se encontra a inibição de 50%.

$$(3) EC_{50} = \left[\frac{(C_2 - C_1)}{(\%i_2 - \%i_1)} \times (50 - \%i_1) \right] + C_1;$$

Onde C2 é a concentração no ponto 2 e C1 no ponto 1, %_{i2} é a percentagem de inibição no ponto 2 e %_{i1} a percentagem de inibição no ponto 1.

Adicionalmente foi calculada a capacidade antioxidante utilizando a reta de calibração de trolox com concentrações de 2,5 a 75 mg/L (Fig. 10) e os valores expressos em equivalentes de trolox utilizando-se a metodologia descrita anteriormente.

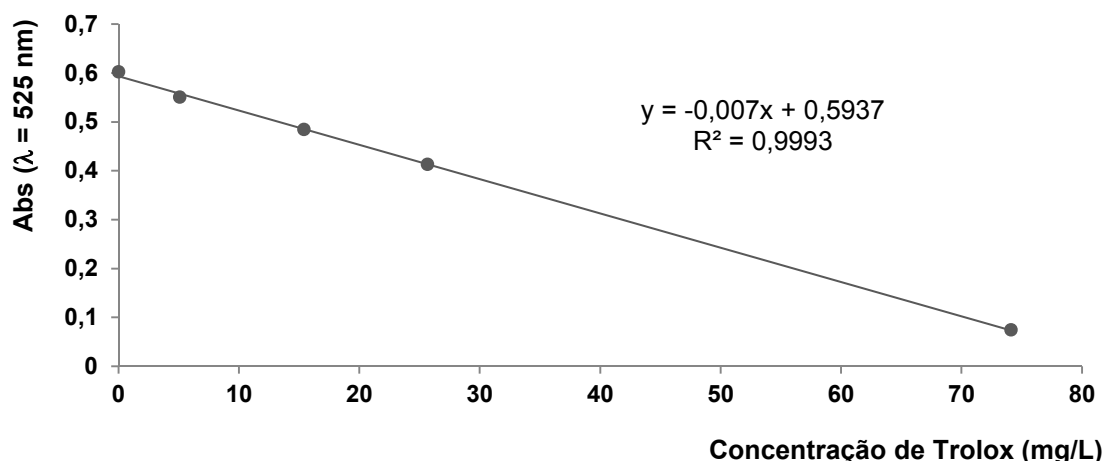


Figura 10. Curva de calibração de Trolox, utilizada para determinar a capacidade de neutralização de radicais livres (DPPH•) dos extratos.

β -carotene bleaching

Efetuarão-se algumas alterações ao método descrito por Barreira *et al.*, (2008). O método consistiu em transferir para tubo 40 mg de ácido linoleico, 400mg de Tween 80 e 1mL de β -caroteno (2 g/L) em clorofórmio. Após remoção do clorofórmio a 40 °C sob vácuo, foram adicionados 100 mL de água destilada seguido de agitação vigorosa até formação de uma emulsão.

Alíquotas (4,8 mL) desta emulsão foram transferidas para tubos contendo 0,2 mL de diferentes concentrações de extrato. Os tubos foram agitados e mantidos em banho-maria (50 °C). Logo que a emulsão foi adicionada a cada tubo, foi lida a absorvência ($\lambda = 470$ nm), correspondente ao tempo zero (T0). Seguiram-se leituras num intervalo de 20 minutos até o ensaio controlo alterar de cor. Foi preparado um branco sem β -caroteno para anular o ruído de fundo. Foi usado TBHQ como padrão controlo.

A atividade antioxidante foi calculada como percentagem de inibição, utilizando a equação (4).

$$(4) \beta - \text{carotene bleaching inhibition (\%)} = \frac{(\text{Quantidade de } \beta\text{-caroteno após 2 horas})}{(\text{Quantidade de } \beta\text{-caroteno inicial})} \times 100;$$

Com os valores das percentagens de inibição para as diferentes concentrações foi utilizada a equação (5) para calcular os valores de EC_{50} para cada extrato. Foram utilizados os valores de percentagem de inibição no intervalo entre duas concentrações, no qual se encontra a inibição de 50%.

$$(5) EC_{50} = \left[\frac{(C_2 - C_1)}{(\%_{i2} - \%_{i1})} \times (50 - \%_{i1}) \right] + C_1;$$

Onde C_2 é a concentração no ponto 2 e C_1 no ponto 1, $\%_{i2}$ é a percentagem de inibição no ponto 2 e $\%_{i1}$ a percentagem de inibição no ponto 1.

FRAP

O método consiste na redução do complexo Fe(III)/ferricianeto $[FeCl_3/K_3Fe(CN)_6]$ a Fe(II), forma ferrosa, pela presença do composto antioxidante na solução.

Tal como referido anteriormente, o poder antioxidante por redução do ião férrico foi determinado segundo metodologia previamente descrita (Benzie e Strain, 1996), tendo sido construída uma curva de calibração de sulfato ferroso com as concentrações 150, 250, 500, 1000, 1250, 1500 e 2000 μM (Fig. 11).

Num tubo de ensaio, colocaram-se 90 μL de extrato, 270 μL de água destilada e 2,7 mL de reagente FRAP (750 mL de tampão acetato 0,3 M, 75 mL solução TPTZ 10 mM e 75mL $FeCl_3$ 20 mM). Homogeneizou-se e colocou-se em banho-maria a 37°C. Após 30 minutos as leituras foram efetuadas espectrofotometricamente ($\lambda = 595 \text{ nm}$) em leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT GENS5, USA).

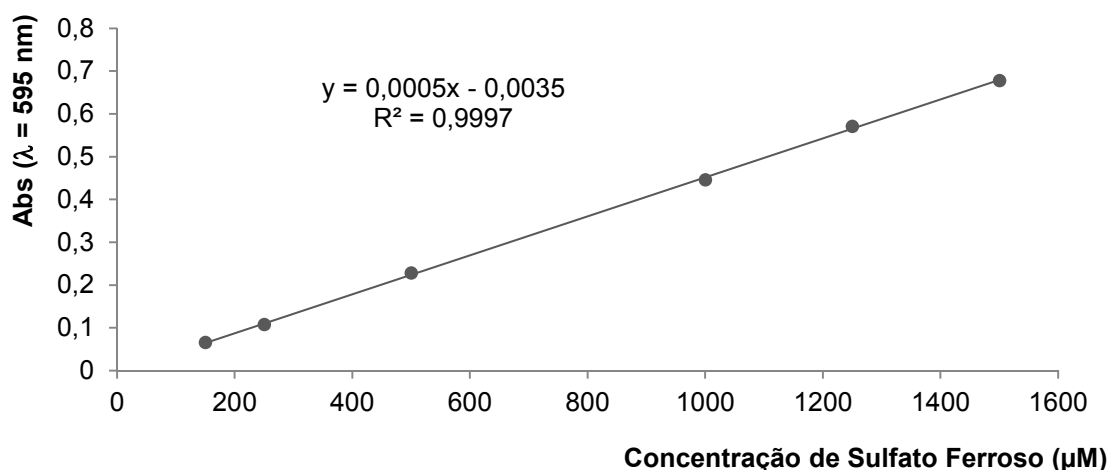


Figura 11. Curva de calibração utilizada para determinar a poder antioxidante por redução do ião férrico (FRAP) dos extratos.

Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando o método de microdiluição em meio líquido segundo metodologia previamente descrita na normativa CLSI (CLSI, 2006).

Para a preparação das soluções *stock*, os extratos liofilizados foram dissolvidos em tampão fosfato – PBS (Phosphate Buffer Saline), pH 7,2 numa concentração final de 10,24 mg/mL. Esta solução *stock* foi subsequentemente submetida a uma filtração (0,2 μm (Millipore Corp., Bedford MA)) e armazenada a 4 °C para posterior utilização. O *screening* da atividade antimicrobiana foi efetuado com os extratos previamente referenciados, e diluídos às concentrações de 10,24; 5,12; 2,56; 1,28; 0,64; 0,32; 0,160; 0,08; 0,04; 0,02 e 0,01 mg/mL.

Os isolados bacterianos testados, previamente cultivados em MH (Mueller Hinton, bioMérieux, France), a 37 °C e *overnight*, com relevância clínica e alimentar, estão indicados na tabela 4.

A leitura dos resultados foi efetuada após 24 horas de incubação a 37 °C. A leitura visual permitiu determinar a CMI (Concentração Mínima Inibitória) de cada um dos extratos testados e a leitura espectrofotométrica (λ = 630 nm) a avaliação do comportamento bacteriano em função de cada um dos extratos. Os resultados desta última apresentação foram interpretados utilizando o *software* GraphPad Prism versão 6.00 (GraphPad, Sandiego, USA).

Todas as experiências foram realizadas independentemente em duplicado com três réplicas biológicas. Usou-se como controlo negativo o meio MH não inoculado e como controlo positivo o meio MH inoculado com o isolado bacteriano.

Tabela 4. Isolados bacterianos utilizados para testar a capacidade antimicrobiana do extrato de pétalas de açafão.

Isolado	Origem	Perfil de susceptibilidade	Referência
Gram +			
<i>Bacillus subtilis</i> BGA	ATCC	Susceptível	Estirpe Referência
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061	ATCC		Estirpe Referência
<i>Bacillus safensis</i> F036-b	NASA (Salas limpas - USA)	Susceptível	Satomi <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus cereus</i> FFUP ₁	FFUP	Susceptível	Branquinho <i>et al.</i> , 2014
<i>Enterococcus faecium</i> BM4105 RF	Hospitalar (Resíduos – HGSA – PT)	Resistente à vancomicina	Grosso <i>et al.</i> , 2012
<i>Listeria inocua</i>	---	Susceptível	Coleção FFUP
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	ATCC	Susceptível	Estirpe Referência
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA FFUP 001	FFUP	Resistente a MET	Branquinho <i>et al.</i> , 2014
<i>Staphylococcus epidermidis</i> TAW 113	Hospitalar (Cateter – Pt)	Resistente a MET e LNZ	Barros <i>et al.</i> , 2014
Gram -			
<i>Acinetobacter baumannii</i> AC92	Hospitalar (Secreção Brônquica – Pt, HGSA)	Resistente a CAZ, ATM, IPM, MEM, PIT, CPM, CIP, MCN	Grosso <i>et al.</i> , 2012
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	ATCC	Susceptível	Estirpe Referência
<i>Klebsiella pneumonia</i> K45	Hospitalar (Infecção Urinária – Pt)	Resistente a CTX e CAZ	Pires <i>et al.</i> , 2013
<i>Enterobacter cloacae</i> K53	Hospitalar (Infecção Ferida – Pt)	Suscetível a CAR	Pires <i>et al.</i> , 2013
<i>Enterobacter cloacae</i> K42	Hospitalar (Infecção – Pt)	Resistente a ETP	Pires <i>et al.</i> , 2013
<i>Salmonella</i> LT2	ATCC	Susceptível	Estirpe Referência
<i>Salmonella</i> Typhimurium F154/22	Alimentar (Portugal)	Resistente a NIT	Antunes <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> P24	Hospitalar (Infecção Respiratória – Pt, HGSA)	Susceptível antibióticos clinicamente relevantes	Coleção FFUP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3B	Hospitalar	Resistente a CAR	Ballesterio <i>et al.</i> , 1996

ATM: aztreonam; CAR: carbapenemos; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacina; CPM: cefepime; CTX: cefotaxima; ETP: ertapenemo; IPM: imipenemo; LNZ: linezolida; MEM: meropenemo; MCN: aminociclina; NIT: nitrofurantoina; PIT: piperacilina; FFUP – Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
 ATCC – American Type Culture Collection
 HGSA – Hospital Geral de Santo António
 NASA – National Aeronautics and Space Administration
 USA- United States of America
 Pt - Portugal

Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge, utilizando linhas celulares Caco 2. Para efetuar os ensaios de avaliação da citotoxicidade foram usados os 3 tipos de extratos preparados e já descritos.

De uma forma geral, o processo seguiu os passos: i) Preparação das linhas celulares; ii) Preparação de microplacas com linhas celulares; iii) Realização dos ensaios MTT, LDH e Proliferação Celular.

Todas as experiências foram realizadas independentemente, em triplicado com três réplicas. O meio DMEM com células sem extrato foi usado como controlo negativo e este mesmo meio com células, sem extrato e com 1% de triton foi usado como controlo positivo.

Tratamento das células

Células Caco-2 foram cultivadas em meio DMEM (4,5 g/L de glucose e 4 mM de L-glutamina) com 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de solução antibiótica e antimicótica e suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por aquecimento. As células foram incubadas em atmosfera humidificada com 5% de CO₂ a 37 °C.

As células Caco-2 confluentes em frasco T foram suspensas com uma solução de tripsina durante 1 minuto a 37 °C. Verifica-se o levantamento das células no microscópio. Após adição de PBS (3 x a quantidade de tripsina) para neutralizar a tripsina, centrifuga-se a 1500rpm durante 5 minutos. Rejeita-se o sobrenadante e o *pellet* (células) é homogeneizado em meio DMEM e transferido para frasco T para recultivar ou em microplaca para efetuar os ensaios.

Viabilidade celular pelo ensaio MTT

A viabilidade celular por MTT foi determinada por um método espectrofotométrico seguindo uma metodologia previamente descrita (Hansen *et al.*, 1989) com ligeiras modificações. A técnica envolveu a determinação da absorvência a 570 nm.

Após incubação da microplaca a 37 °C para multiplicação e adesão celular, retirou-se o meio DMEM e adicionaram-se as soluções ensaio: 100 µL de diferentes concentrações dos extratos em meio DMEM, branco (meio DMEM) e controlo positivo (meio DMEM com

1% de triton). Incubou-se a 37 °C durante 1 e 24 horas. Retirou-se a solução em ensaio e colocaram-se 100 µL de MTT. Seguiu-se uma incubação a 37 °C durante 4 horas. Removeu-se o MTT e adicionaram-se 200 µL de DMSO. Ressuspendeu-se e incubou-se durante 10 minutos. Efetuou-se a leitura espectrofotometricamente ($\lambda = 570$ nm) em leitor de microplacas (BioTek Instruments, Cambrex elx808, USA).

Morte Celular pelo ensaio LDH

A morte celular pelo ensaio LDH envolveu a utilização do *Kit LDH Cytotoxicity Detection* (Roche, Alemanha) e a medida da absorvência a 500 nm.

Após incubação da microplaca a 37 °C, para multiplicação e adesão celular, retirou-se o meio DMEM e adicionaram-se 100 µL da solução ensaio: diferentes concentrações dos extratos em meio DMEM, branco (meio DMEM) e controlo positivo (meio DMEM com 1% de triton). Incubou-se a 37 °C durante 1 e 24 horas. Retiraram-se para outra placa 100 µL de sobrenadante sem remover células do fundo. Colocaram-se 100 µL da solução de reação. Após 30 minutos a 37 °C Efetuou-se a leitura espectrofotometricamente ($\lambda = 500$ nm) em leitor de microplacas (BioTek Instruments, Cambrex elx808, USA).

Proliferação Celular

O método da proliferação celular consiste em verificar a resposta celular, após exposição durante um determinado tempo a um determinado composto. Serve para vermos se as células conseguem recuperar à exposição a um agente citotóxico ou se a sua proliferação é afetada após essa exposição.

A proliferação celular foi determinada por um método espectrofotométrico seguindo uma metodologia previamente descrita (Hansen *et al.*, 1989) com ligeiras modificações. A técnica envolveu a medida da absorvência, a 570 nm.

Após incubação da microplaca a 37 °C para multiplicação e adesão celular, retirou-se o meio e adicionaram-se 100 µL de solução ensaio: diferentes concentrações dos extratos em meio DMEM), branco (meio DMEM) e controlo positivo (meio DMEM com 1% de triton). Incubou-se durante 1 e 24 horas. Retirou-se a solução ensaio e colocaram-se 100 µL de meio DMEM. Incubou-se a 37 °C durante 48 horas.

Retirou-se o meio DMEM e colocaram-se 100 µL de MTT. Incubou-se a 37 °C durante 4 horas.

Removeu-se o MTT e adicionaram-se 200 μ L de DMSO. Ressuspendeu-se e incubou-se durante 10 minutos. Efetuou-se a leitura espectrofotometricamente (λ = 570 nm) em leitor de microplacas (BioTek Instruments, Cambrex elx808, USA).

Resultados e Discussão

Método de Extração

Conforme referido anteriormente, a base deste trabalho visa a valorização de um subproduto da indústria das especiarias, as pétalas de açafraão.

Muitas vezes, faz-se a valorização de subprodutos sem ter em atenção a sustentabilidade do processo utilizado para tal.

Nesse sentido, foram considerados como solventes extratores, apenas a água e o etanol, uma vez que são económicos e o produto resultante da extração pode ser utilizado na indústria alimentar devido à sua inocuidade. Outras variáveis consideradas na otimização do método foram os tempos e temperaturas de extração. Não se procedeu à extração durante períodos mais longos do que três horas, por questões de sustentabilidade económica. Embora este ensaio tenha sido efetuado em microescala, o objetivo futuro será a sua transposição para escala industrial.

De forma a comparar as taxas de extração nas diferentes condições, foram quantificados os compostos fenólicos totais.

A tabela 5 apresenta os valores obtidos, expressos em equivalentes de ácido gálico.

Os resultados apresentados são a média aritmética de experiências independentes realizadas em duplicado, com 3 réplicas, correspondendo o erro associado ao desvio padrão. Não foi possível realizar mais ensaios dada a quantidade limitada de amostra.

Tabela 5. Teor de Compostos Fenólicos Totais dos extratos obtidos com diferentes concentrações (5; 2,5; 1,66; 1), solventes (água, álcool, mistura 1:1 água álcool), temperaturas (temperatura ambiente e 40°C) e tempos de extração (1, 2 ou 3h). [EAG: Equivalentes de Ácido Gálico; DP: Desvio Padrão].

Conc. (g/L)	Temp. (°C)	Tempo (h)	Solvente	
			Aquoso	Hidroalcoólico
5	20 ± 3	1	28,32 ± 0,10	28,50 ± 3,01
		2	31,74 ± 0,87	28,75 ± 8,29
		3	32,05 ± 0,30	28,49 ± 0,20
	40 ± 3	1	27,85 ± 1,01	28,80 ± 1,92
		2	31,92 ± 0,10	32,07 ± 1,00
		3	35,25 ± 0,08	32,46 ± 1,39
2,5	20 ± 3	1	31,92 ± 0,10	32,07 ± 1,00
		2	35,25 ± 0,08	32,46 ± 1,39
		3	36,32 ± 0,10	33,51 ± 0,51
	40 ± 3	1	34,82 ± 0,30	36,58 ± 0,61
		2	33,76 ± 1,52	34,22 ± 1,66
		3	37,28 ± 0,10	36,40 ± 0,65
1,66	20 ± 3	1	33,76 ± 1,52	34,22 ± 1,66
		2	37,28 ± 0,10	36,40 ± 0,65
		3	37,83 ± 0,30	35,16 ± 0,71
	40 ± 3	1	36,98 ± 4,24	39,10 ± 0,71
		2	35,44 ± 0,20	38,19 ± 0,33
		3	35,44 ± 0,20	38,19 ± 0,33
1	20 ± 3	1	35,44 ± 0,20	38,19 ± 0,33

	2	41,23 ± 0,01	38,52 ± 0,59
	3	41,41 ± 0,20	40,55 ± 1,98
40 ± 3	1	41,05 ± 0,51	41,64 ± 0,22

A figura 12 apresenta os dados da tabela 5 na forma de gráfico.

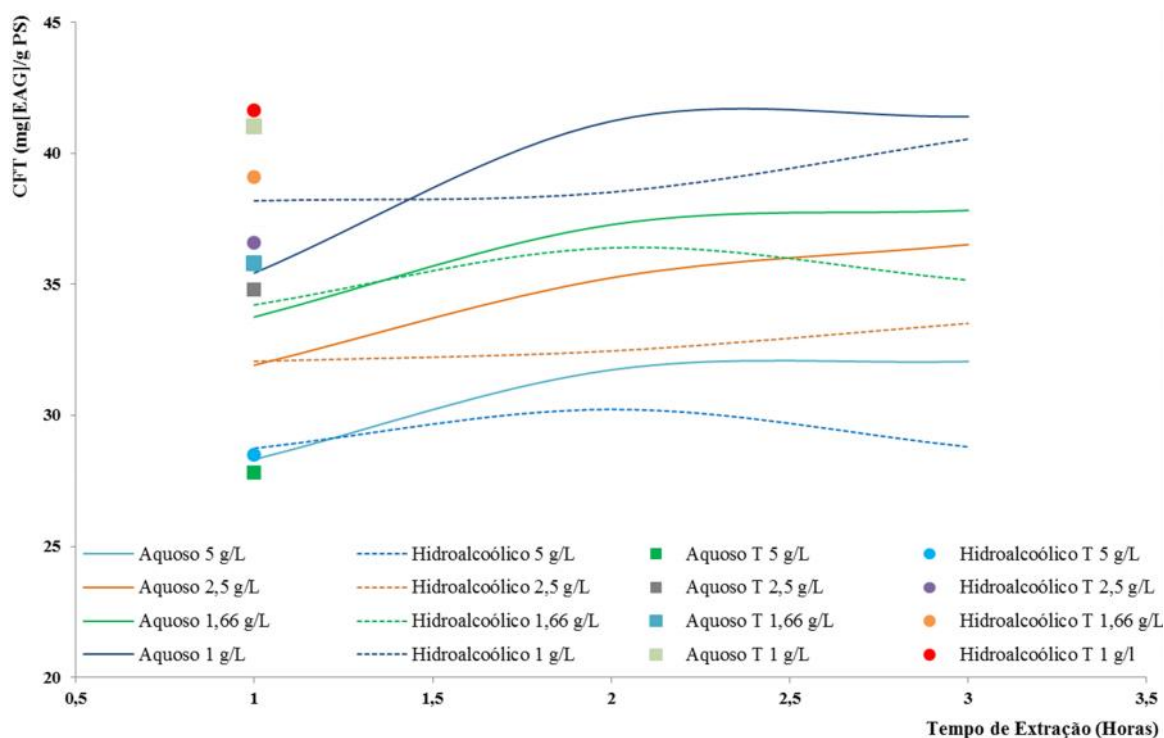


Figura 12. Teor de Compostos Fenólicos Totais dos extratos obtidos com diferentes concentrações (5; 2,5; 1,66; 1), solventes (água, álcool, mistura 1:1 água álcool), temperaturas (temperatura ambiente e 40°C) e tempos de extração (1, 2 ou 3h). [T: Temperatura (40°C); EAG: Equivalentes de Ácido Gálico].

Após análise da tabela 5 e da figura 12, verifica-se que concentrações mais elevadas de amostra resultam numa taxa de compostos fenólicos totais (mg [EAG]/g) equivalente ou até mais baixa. Explicações possíveis são a saturação dos solventes, não retirando todos os compostos fenólicos presentes na amostra liofilizada, ou então a presença de um maior número de interferentes nos extratos mais concentrados, o que faz diminuir o sinal. O que efetivamente se verifica é que uma redução de 5 vezes da concentração de extrato (de 5 g/L para 1 g/L) levou a um incremento no teor de fenóis totais de 25% (passaram de 30 mg/g para 40 mg/g).

O rendimento mais elevado de compostos fenólicos (41,6 ± 0,22 mg [EAG]/g) foi obtido com a mistura hidroalcoólica (EtOH:H₂O (1:1), v/v), a 40 °C, durante 1h, com uma concentração de amostra de 1 g/L. O menor rendimento de compostos fenólicos (28,32 ± 0,10 mg [EAG]/g) foi obtido com a água, a 40 °C, durante 1h, com uma concentração de amostra de 5 g/L.

Pelos valores da tabela 5, o melhor extrato foi o obtido com a mistura hidroalcoólica à temperatura de 40°C e com 1 g/L de concentração de extrato. De notar que o extrato obtido com solvente aquoso nas mesmas condições (40°C, 1h, 1g/L) apresentou um teor de compostos fenólicos totais ligeiramente inferior, mas que não difere significativamente. Um valor semelhante pode também ser obtido por extração com água durante 2 e 3 horas, à temperatura ambiente. Qualquer dos extratos pode ser considerado sustentável, embora economicamente seja melhor a utilização de água como solvente. Também um fator a ter em consideração será o consumo energético.

Determinação de Compostos Bioativos

Os compostos bioativos avaliados foram os compostos fenólicos, flavonoides, taninos e antocianinas. Os resultados apresentados são a média de experiências independentes, realizadas em triplicado, sendo que, o erro associado corresponde ao desvio padrão. Realizou-se inicialmente uma análise qualitativa (tabela 6) de forma a conhecermos, de uma forma geral, a matriz da nossa amostra.

Tabela 6. Análise Qualitativa de alguns compostos.

Teste	Solvente		
	Água	Etanol:Água (1:1), v/v	Etanol
Açúcares	+	+	+
Açúcares Redutores	-	-	-
Alcaloides	-	-	-
Fenólicos	+	+	+
Flavonoides	+	+	+
Saponinas	+	+	+
Taninos	+	+	+
Terpenoides	+	+	+

Pela observação da tabela 6 pode verificar-se que os extratos têm uma composição qualitativa semelhante. Todos têm na sua composição fenóis, flavonoides, saponinas, taninos e terpenoides e açúcares. Pelo contrário não contêm alcaloides nem açúcares redutores.

Após este reconhecimento qualitativo, optou-se pela quantificação de alguns dos compostos presentes, nomeadamente os fenólicos, flavonoides e taninos. Estes compostos bioativos estão associados a efeitos benéficos para a saúde de quem os

consome, estando descritas atividades antioxidante, antimicrobiana e imunomodulatória (Acosta *et al.*, 2014).

Foram também avaliadas as antocianinas. A sua quantificação justificou-se devido à sua presença frequente na natureza, especialmente em pétalas de flores (Tsuda *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos apresentam-se na tabela 7.

Tabela 7. Determinação de compostos bioativos utilizando um extrato 1 g/L [EtOH:H₂O (1:1), 40 °C 1h] (PS: Peso Seco).

Ensaio	Resultados
Antocianinas Totais¹ mg/g	56,6 ± 0,08
Flavonoides Totais² mg/g	19,0 ± 0,74
C. Fenólicos Totais³ mg/g	41,6 ± 1,02
Taninos Totais mg/100g⁴	4,8 ± 0,09

¹ Expresso em equivalentes de Cianidina ² Expresso em equivalentes de Catequina

³ Expresso em equivalentes de Ácido Gálico ⁴ Expresso em equivalentes de Ácido Tânico

Comparativamente com valores de compostos fenólicos totais descritos para o açafrão (42,3 mg [EAG]/g) (Hosseini *et al.*, 2012), para outras pétalas como as de *Hibiscus sabdarifa* (23,0 mg [EAG]/g) (Tsai *et al.*, 2002) e para subprodutos como a casca de maçã (20,1 mg [EAG]/g) (Agourram *et al.*, 2013) parece possível verificar que as pétalas de *Crocus sativus* L. (41,6 mg [EAG]/g) são uma matriz com teores consideráveis na sua classe.

Citam-se valores de compostos fenólicos totais para pétalas de *Crocus sativus* L. superiores aos obtidos, no entanto, são expressos em equivalentes de Kaempferol (90,1 [EK]/g PS) (Serrano-Díaz *et al.*, 2012) não sendo, por isso, possível correlacionar os valores mas indiciando, uma vez mais, o potencial das pétalas nestes compostos.

Relativamente aos valores de flavonoides totais que estão descritos para o açafrão (2,9 mg [ERutina]/g) (Karimi *et al.*, 2010) e para outras pétalas como as de nespereira (7,45 mg [ECatequina]/g) (Zhou *et al.*, 2011). Comparativamente com o valor obtido para os flavonoides das pétalas de *Crocus sativus* (19,0 mg [ECatequina]/g) verifica-se que estas apresentam uma quantidade de flavonoides superior. Há estudos descritos com valores equivalentes aos obtidos (22,3 mg/g [ECatequina]/g) (Goupy *et al.*, 2013).

O mesmo se aplica aos teores de antocianinas.

Valores de antocianinas totais para cascas de mangostão, um subproduto (2,9 mg [ECianidina]/g) (Cheok *et al.*, 2013) e para pétalas de rosa (3,75 mg [ECianidina]/g) (Lee *et al.*, 2011) mostram que as pétalas de *Crocus sativus* L. (56,6 mg [ECianidina]/g) parecem ser uma fonte destes compostos com algum potencial.

Foi demonstrada a ausência de antocianinas no açafrão (Hossein *et al.*, 2002) e estudos equivalentes realizados em pétalas de *Crocus sativus* L. vão de acordo com o valor obtido (34,24 mg [cianidina]/g) (Khazaei *et al.*, 2014).

Relativamente aos taninos, esta matriz não tem um comportamento tão promissor pois foram descritos valores muito superiores noutros subprodutos, caso do pericarpo de *Juglans mandshurica* (358,23 mg [EAG]/100g) (Wang *et al.*, 2011), de flores de ulmeira (124,8 mg [EAG]/100g) (Fecka *et al.*, 2009) e de sementes de roseira (126 mg [EAG]/100g) (Fecka *et al.*, 2009).

Alguns trabalhos publicados referem a ausência de taninos no açafrão e a presença na pétala (Hossein *et al.*, 2002). No entanto, nenhum estudo tinha sido realizado anteriormente com o intuito de os quantificar.

Atividade Antioxidante

DPPH

Os resultados obtidos estão apresentados em sumário na tabela 8.

Tabela 8. Percentagem de inibição do radical DPPH• pelos diferentes extratos com diferentes concentrações de amostra.

Concentração	Aquoso	Hidroalcoólico	Etanólico
[0,25 g/l]	3,7 ± 0,43	5,3 ± 0,35	8,5 ± 2,54
[0,5 g/l]	19,4 ± 0,93	20,8 ± 0,79	15,6 ± 1,36
[1 g/l]	34,1 ± 1,16	36,1 ± 2,16	29,2 ± 2,00
[2,5 g/l]	48,6 ± 0,77	78,0 ± 0,42	50,7 ± 0,39
[5 g/l]	61,6 ± 1,79	82,9 ± 0,40	77,1 ± 1,35

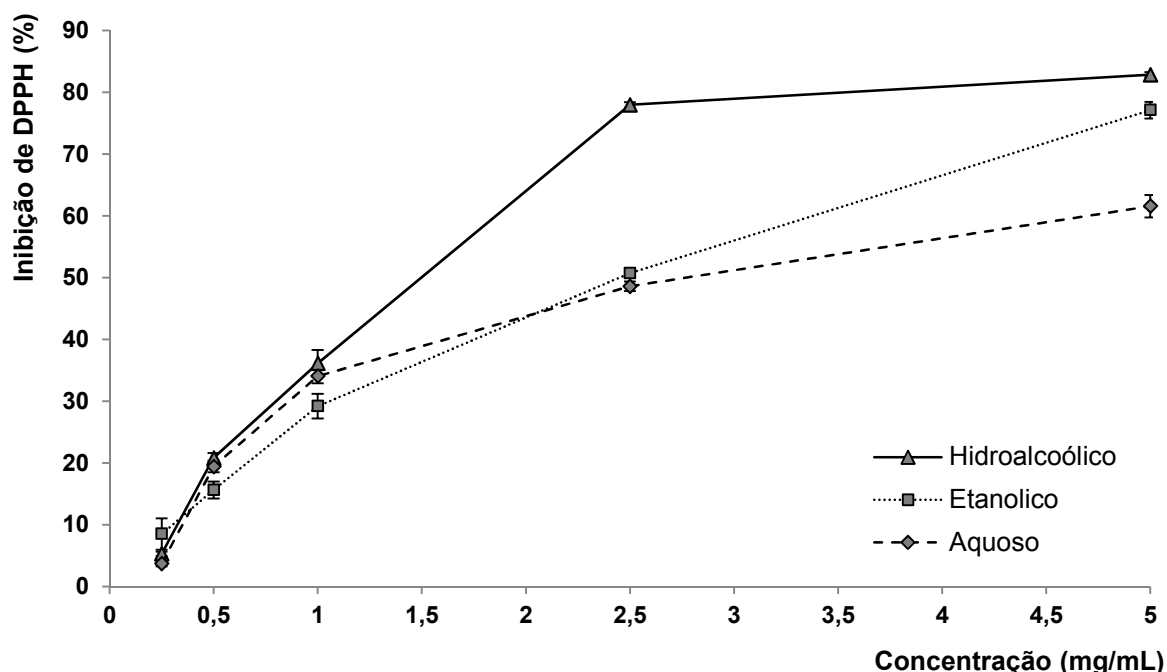


Figura 13. Percentagem de inibição do radical DPPH• relativamente a diferentes concentrações de extratos de pétalas de *Crocus sativus*.

A leitura da absorvência de 2 em 2 minutos para as diferentes concentrações permitiram monitorizar a reação e perceber quando ocorria a estabilização desta. Foram utilizados os valores de percentagem de inibição no intervalo entre duas concentrações no qual se encontra a inibição de 50% para o cálculo dos valores de EC_{50} apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Valores de EC_{50} para os ensaios DPPH• e β -caroteno para os diferentes extratos. Valores expressos em g/L.

EC_{50}	Aquoso	Hidroalcoólico	Etanólico
DPPH	$2,7 \pm 0,14$	$1,5 \pm 0,05$	$2,5 \pm 0,03$

Os valores determinados no ensaio DPPH permitiram, além de determinar a percentagem de inibição também calcular o EC_{50} dos extratos em estudo. A interpretação dos valores deste parâmetro permite verificar que o extrato hidroalcoólico é o melhor com valores da ordem de 1,5 g/L comparativamente com 2,5 g/L e 2,7 g/L para os outros dois extratos em avaliação.

Estão descritos valores deste parâmetro para outras matrizes como por exemplo pétalas de *Hibiscus sabdariffa* (0,24 g/L) (Pacôme *et al.*, 2014), pétalas de rosa *coreana* (0,55 g/L) (Lee *et al.*, 2011) pétalas de rosa *damascena* (0,52 g/L) (Yassa *et al.*, 2009).

Os valores referidos tornam a matriz em estudo (pétalas da flor de açafrão) pouco atrativa neste âmbito.

Os resultados obtidos para a quantificação da capacidade antioxidante equivalente ao trolox, utilizando o radical DPPH• estão apresentados na tabela 10.

Foi utilizado o extrato com concentração 1 g/L a 40 °C durante 1 hora.

Tabela 10. Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox.

Capacidade de neutralizar radicais DPPH•*	Extrato		
	Hidroalcoólico	Aquoso	Etanólico
	13,6 ± 0,33	10,4 ± 1,54	9,3 ± 0,31

* Expresso em mg [ET]/g [ET: Equivalentes de Trolox]

A análise da tabela 10 indicia que o extrato hidroalcoólico será o mais eficaz a inibir o radical DPPH•, apresentando por isso a melhor capacidade antioxidante dos três extratos. Estes resultados estão de acordo com o que foi demonstrado anteriormente através da figura 13.

Valores de equivalentes de trolox para a casca de banana, um subproduto (32 mg [ET]/g) (González *et al.*, 2010), para as folhas de erva-cidreira (155,2 mg [ET]/g) (Lin *et al.*, 2012) e para as pétalas de rosa (200 mg [ET]/g) (Lee *et al.*, 2011), quando comparados com o melhor valor de equivalentes de trolox obtido para as pétalas de *Crocus sativus* (13,52 mg [ET]/g) revelam que as pétalas apresentam um número de equivalentes de Trolox baixo, no entanto, conforme literatura, superior ao espectável (3,43 mg [ET]/g) (Serrano-Díaz *et al.*; 2012).

Relativamente a estes dois ensaios, apesar das pétalas de *Crocus sativus*, de uma forma geral, apresentarem uma atividade antioxidante inferior ao que se podia especular, quando comparada com valores de outras matrizes para os mesmos ensaios, essa atividade antioxidante existe, sendo de frisar novamente que, uma quantia considerável destas pétalas é desperdiçada aquando da produção de açafraão.

β-carotene Bleaching

Os resultados obtidos estão apresentados em sumário na tabela 11.

Tabela 11. Percentagem de inibição do ensaio *β-carotene bleaching* pelos diferentes extratos com diferentes concentrações de amostra.

Concentração	Aquoso	Hidroalcoólico	Etanólico
[0,25 g/L]	12,2 ± 1,15	16,8 ± 0,62	13,7 ± 1,92
[0,5 g/L]	22,9 ± 0,82	27,1 ± 2,60	27,7 ± 1,53
[1 g/L]	33,9 ± 1,02	49,2 ± 1,06	46,4 ± 0,56
[2,5 g/L]	48,3 ± 0,67	67,9 ± 0,37	60,0 ± 0,02
[5 g/L]	73,7 ± 0,18	81,1 ± 0,21	75,6 ± 0,02

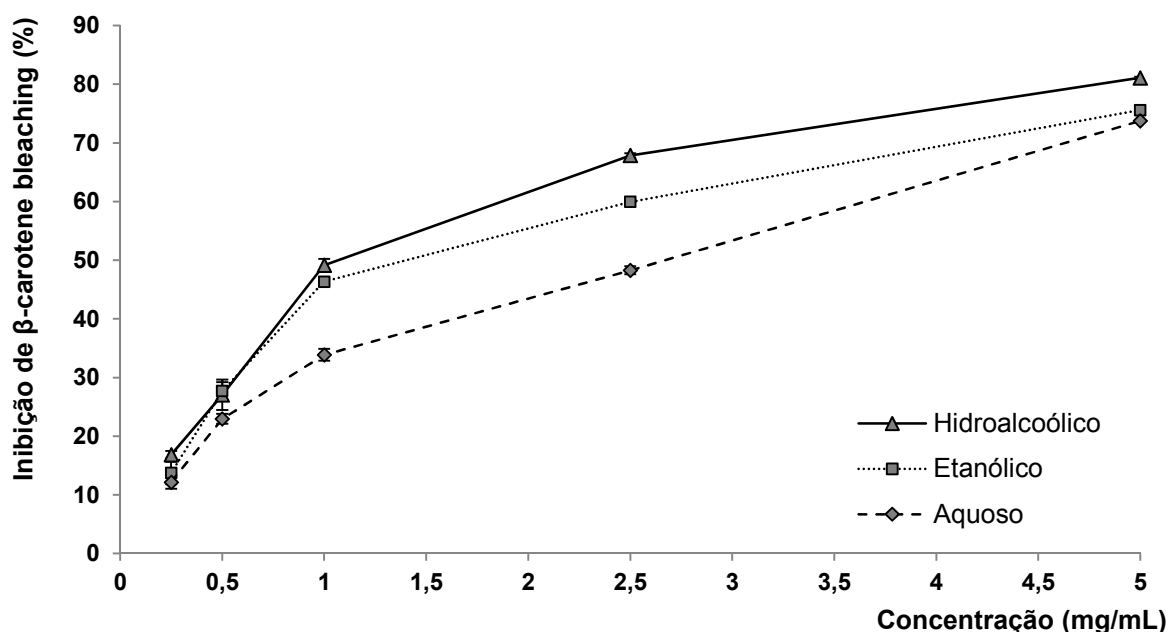


Figura 14. Percentagem de inibição de *β-carotene bleaching* relativamente a diferentes concentrações de extratos polares de pétalas de *Crocus sativus*

A leitura da absorvência de 20 em 20 minutos para as diferentes concentrações permitiram monitorizar a reação e perceber quando ocorria a estabilização desta. Foram utilizados os valores de percentagem de inibição no intervalo entre duas concentrações no qual se encontra a inibição de 50% para o cálculo dos valores de EC_{50} apresentados na tabela 12.

Tabela 12. Valores de EC_{50} para o ensaio *β-caroteno* para os diferentes extratos. Valores expressos em g/L.

EC_{50}	Aquoso	Hidroalcoólico	Etanólico
β-Caroteno	2,66 ± 0,06	1,02 ± 0,01	1,36 ± 0,03

Relativamente ao ensaio do *β-carotene bleaching*, verifica-se uma situação semelhante à descrita para o ensaio do DPPH. Também neste caso o extrato hidroalcoólico a 1 g/L apresenta o valor mais adequado comparativamente com os outros dois tipos de extrato. Relativamente ao EC_{50} as flores (0,161 g/L) e folhas de castanheiro (0,145 g/L) (Barreira *et al.*, 2008) bem como a casca de amêndoa (0,23 g/L) (Barreira *et al.*, 2010), apresentam valores muito mais baixos que as pétalas de *Crocus sativus* L. (1,02 ± 0,01 g/L) o que, mais uma vez, tornam esta matriz pouco promissora neste âmbito.

Tal como referido anteriormente, verifica-se também neste ensaios (DPPH e *β-caroteno*) que os extratos mais concentrados apresentam uma percentagem de inibição demasiado

elevadas. Tal como referido a concentração mais indicada parece ser a de 1 g/L que apresenta percentagens de inibição entre 29 e 36%.

A mistura hidroalcoólica apresenta o melhor valor para este parâmetro.

FRAP

Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13. Poder antioxidante por redução do ião férrico (expresso em μM [ESF]). (ESF: Equivalentes de Sulfato Ferroso)

Concentração do Extrato (g/L)	Extrato		
	Água	Mistura	Etanol
0,25	204,8 \pm 3,54	184,8 \pm 7,07	121,0 \pm 5,30
0,5	267,3 \pm 3,54	187,3 \pm 3,54	134,8 \pm 3,54
1	307,6 \pm 7,07	264,8 \pm 10,61	151,0 \pm 1,75
2,5	667,6 \pm 3,54	552,3 \pm 3,54	296,0 \pm 1,50
5	1086,0 \pm 5,30	1139,8 \pm 31,82	518,5 \pm 1,70

Com os valores de equivalentes de sulfato ferroso expressos na tabela 13 foram calculados os valores de equivalentes de sulfato ferroso por grama de pétala (tabela 14) e construídas as retas apresentadas nas figuras 15 e 16.

Tabela 14. Poder antioxidante por redução do ião férrico (expresso em μmol [ESF]/g PS). (ESF: Equivalentes de Sulfato Ferroso)

Concentração do Extrato (g/L)	Extrato		
	Água	Mistura	Etanol
0,25	819,0 \pm 14,14	739,0 \pm 28,88	484,0 \pm 21,21
0,5	534,5 \pm 7,07	374,5 \pm 7,07	269,5 \pm 7,07
1	307,3 \pm 7,07	264,8 \pm 10,60	151,0 \pm 1,76
2,5	266,7 \pm 1,41	220,7 \pm 1,41	118,3 \pm 0,70
5	216,2 \pm 1,05	227,0 \pm 6,33	103,2 \pm 0,35

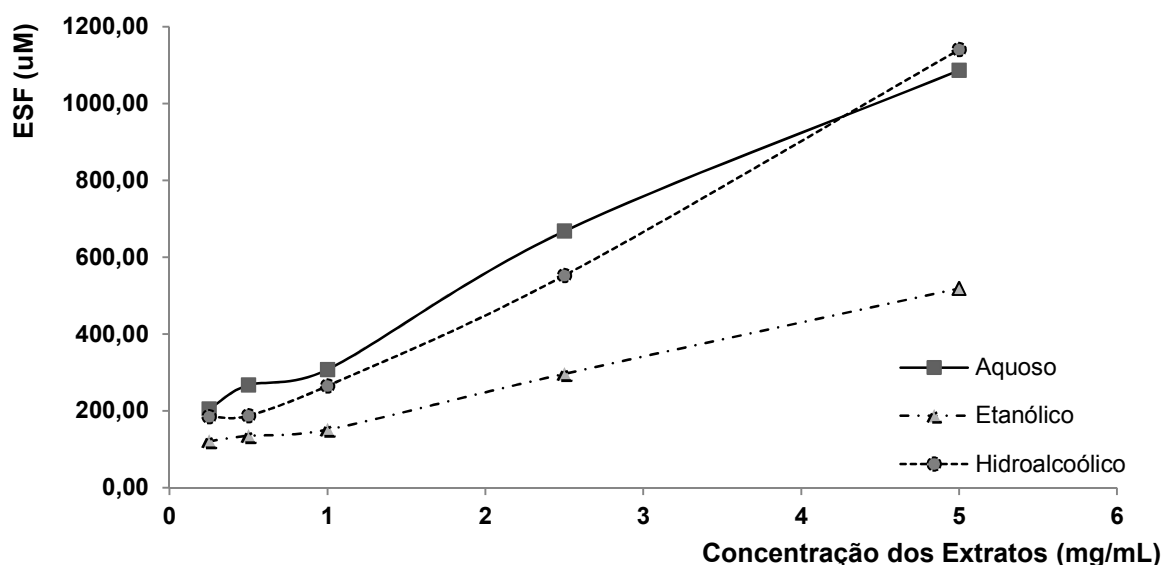


Figura 15. Poder Férrico Redutor expresso em μM [ESF] relativamente a diferentes concentrações de extratos de pétalas de *Crocus sativus*. [ESF: Equivalentes de Sulfato Ferroso]

A análise do gráfico da figura 15 permite-nos compreender que para o poder antioxidante por redução do ião férrico, ao contrário do que acontece nos ensaios antioxidantes anteriores, o melhor extrato parece ser o aquoso.

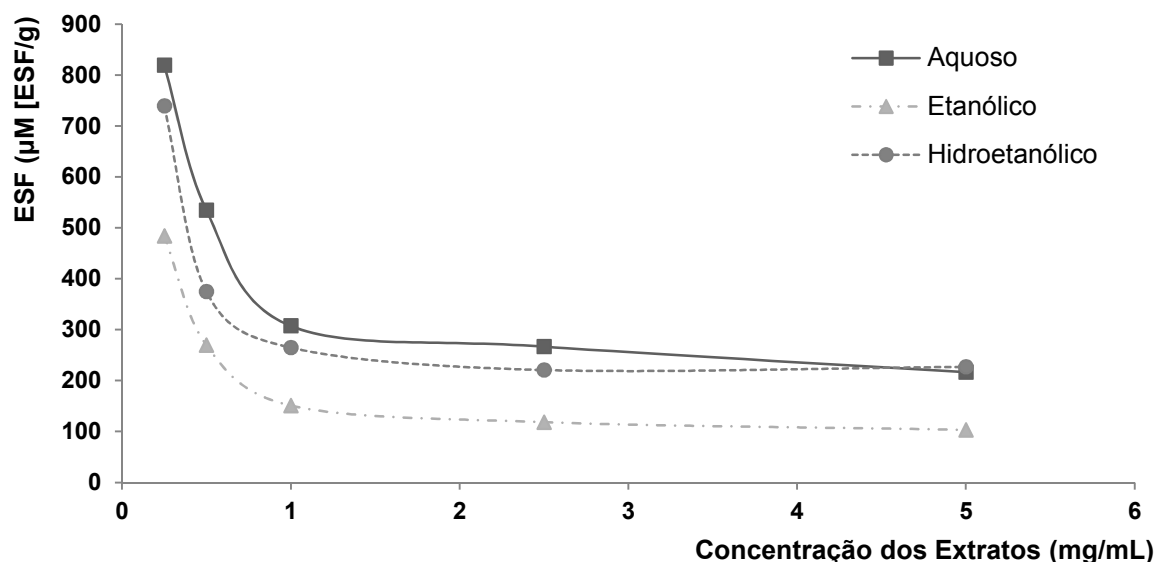


Figura 16. Poder Férrico Redutor expresso em μM [ESF]/g relativamente a diferentes concentrações de extratos de pétalas de *Crocus sativus*. [ESF: Equivalentes de Sulfato Ferroso]

A análise do gráfico da figura 16 parece induzir que, para as concentrações de extrato de 0,25 g/L e 0,50 g/L se obtêm mais equivalentes de sulfato ferroso (mg [ESF]/g), no entanto, é de notar uma estabilização dos extratos entre as concentrações de 1 g/L e 5

g/L, este facto pode ser explicado pelo declive da reta de calibração e do sinal obtido para as concentrações mais baixas. Pode ser observado um declive muito pequeno na reta de calibração de sulfato ferroso (Fig. 11), levando a variações de sinal muito baixas para pequenas diferenças de concentração. Por esse facto, para concentrações muito baixas, cujas absorvências correspondentes são inferior a 0,1, não há uma grande diferença de sinal relativamente a outras concentrações próximas, mas, no entanto, é aplicado um fator de diluição considerável induzindo a valores de equivalentes de sulfato ferroso muito superiores aos espectáveis e fora da linearidade.

As pequenas variações observadas nas concentrações entre 1 g/L e 5 g/L podem ser explicadas pelas interferências inerentes ao método referidas anteriormente na introdução prática, uma vez que extratos mais concentrados terão mais interferentes.

Com tais pressupostos foram apenas consideradas as concentrações entre 1 g/L e 5 g/L. Valores de poder antioxidante por redução do ião férrico para as cascas de romã, (821,10 μmol [ESF]/g) (Guo *et al.*, 2003), para as cascas de limão (23,00 μmol [ESF]/g) (Guo *et al.*, 2003) e para as cascas de manga (101,30 μmol [ESF]/g) (Guo *et al.*, 2003), três subprodutos, quando comparados com o valor obtido para o poder antioxidante por redução do ião férrico das pétalas de *Crocus sativus* (307,25 \pm 14,14 μmol [ESF]/g) revelam que as pétalas apresentam um poder antioxidante por redução do ião férrico considerável.

Atividade Antimicrobiana

Não foram encontrados estudos que evidenciem a atividade antibacteriana das pétalas de *Crocus sativus* L. no entanto, alguns estudos demonstraram a presença de atividade antibacteriana para os estigmas de *Crocus sativus* L. (açafrão), associada aos compostos safranal e crócina (Pintado *et al.*, 2011) indicando o interesse do presente trabalho. Os resultados obtidos não nos permitiram observar o mesmo efeito para as pétalas. Não havendo referências, a presença destes compostos na pétala da flor do açafrão parece estar ausente o que permite justificar os resultados obtidos.

Na pesquisa de atividade antibacteriana dos diferentes extratos obtidos (aquoso, etanólico, hidroalcoólico) a partir de pétalas de *Crocus sativus* L., nenhum deles revelou atividade bactericida compatível com a presença de um composto antibacteriano. Os extratos foram testados contra um painel de bactérias de Gram positivo e Gram negativo com relevância clínica e alimentar, conforme o indicado na tabela 4. Assim a de cada um dos extratos testados, CMI > 10,24 mg/mL.

De forma a avaliar-se o efeito de cada um dos extratos supracitados no crescimento de cada um dos isolados testados, foi efetuada uma leitura espectrofotométrica (630 nm),

cujas representações estão apresentadas nas figuras 17, 18 e 19. Para esta análise apenas os isolados representativos de cada espécie estão assinalados, uma vez que se observou um comportamento semelhante em função da espécie testada. Os resultados evidenciaram que nenhum dos extratos (aquoso, etanólico, hidroalcoólico) apresentou um efeito redutor no crescimento dos isolados testados.

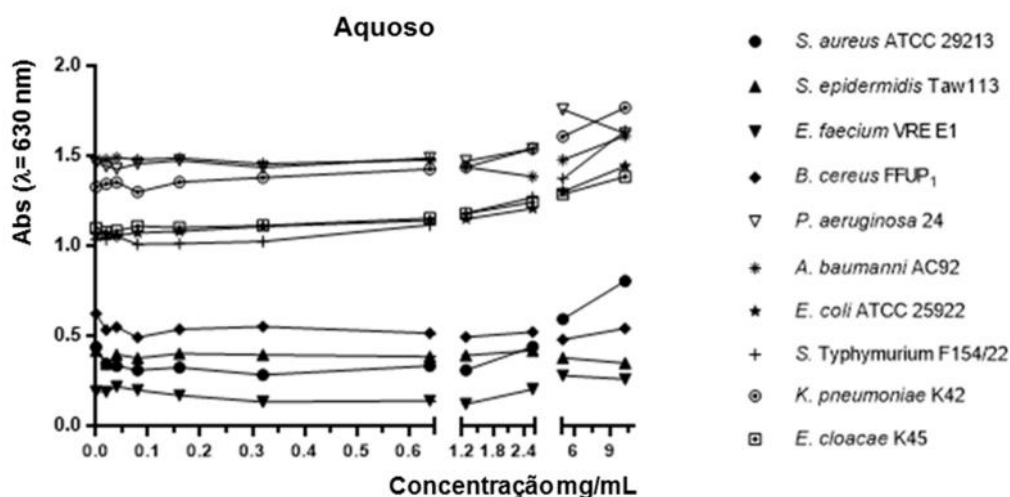


Figura 17. Avaliação do efeito de extrato aquoso de pétalas de *Crocus sativus* L. em isolados bacterianos representativos das diferentes espécies testadas.

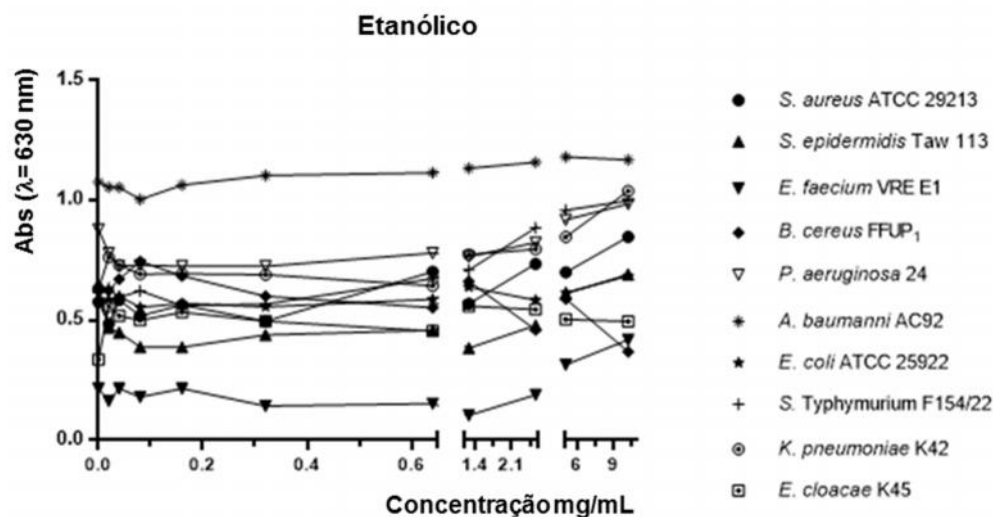


Figura 18. Avaliação do efeito de extrato etanólico de pétalas de *Crocus sativus* L. em isolados bacterianos representativos das diferentes espécies testadas.

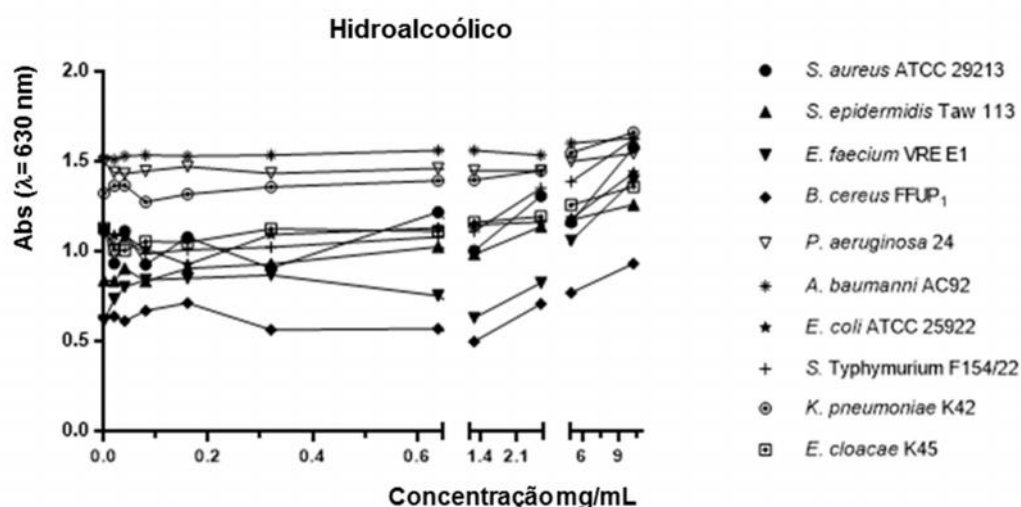


Figura 19. Avaliação do efeito de extrato hidroalcoólico de pétalas de *Crocus sativus* L. em isolados bacterianos representativos das diferentes espécies testadas.

Um ligeiro aumento no crescimento bacteriano, aquando da presença de elevadas concentrações do extrato aquoso, parece observar-se nomeadamente para *S. aureus* ATCC 29213, *A. baumannii* AC92, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* K42 e *E. cloacae* (Fig. 17). De igual forma, quando se aplica o extrato etanólico parece observar-se um ligeiro aumento no crescimento de *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* Taw 113, *E. faecium* VRE E1 e *K. pneumoniae* K42 (Fig. 18) e para extrato hidroalcoólico para todos os isolados bacterianos representativos testados (Fig. 19).

Estes resultados parecem assim indiciar a presença de compostos que estimulam o desenvolvimento bacteriano. Este facto foi já reportado para outros compostos como sendo lipopéptidos, aminoácidos, iões ou mesmo moléculas energéticas (Fowler *et al.*, 2008). Para comprovar esta hipótese seriam no entanto necessários mais estudos, de forma a suportar a relevância estatística do favorecimento do crescimento, verificado pela aplicação dos diferentes extratos.

Por outro lado, como os extratos obtidos para cada uma das frações testadas não foi detalhadamente caracterizado, uma vez que o objetivo do estudo se prendeu com a utilização do subproduto *per se*, não se pode invalidar a possibilidade de estarem presentes nas pétalas de *Crocus sativus* L. outros compostos, que não os bibliograficamente reportados, que apresentam atividade antimicrobiana, mas que estejam presentes nestes extratos em concentrações insuficientes para ser observada a sua ação. Assim, estudos futuros poderão ser conduzidos de forma a avaliar bioquimicamente os diferentes componentes presentes em cada extrato, e consequentemente a bioatividade desses produtos parcialmente purificados.

Citotoxicidade

O ensaio MTT foi utilizado como método de avaliação da viabilidade e proliferação celulares. O ensaio LDH, foi também realizado como forma de avaliação da viabilidade celular; no entanto, os resultados obtidos com esta técnica apresentaram erros de grandeza superior ao aceitável, demonstrando menor sensibilidade e sendo por isso removidos da versão final deste trabalho.

Os resultados são apresentados como a média dos valores obtidos em três experiências independentes, com cada um dos ensaios a ser realizado em triplicado. As barras de erro mostradas nos gráficos (Fig. 20-25) correspondem aos erros padrão.

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* Microsoft Excel, versão 14.0.7116.5000 (Microsoft Corporation, USA).

Extrato Aquoso

Viabilidade celular

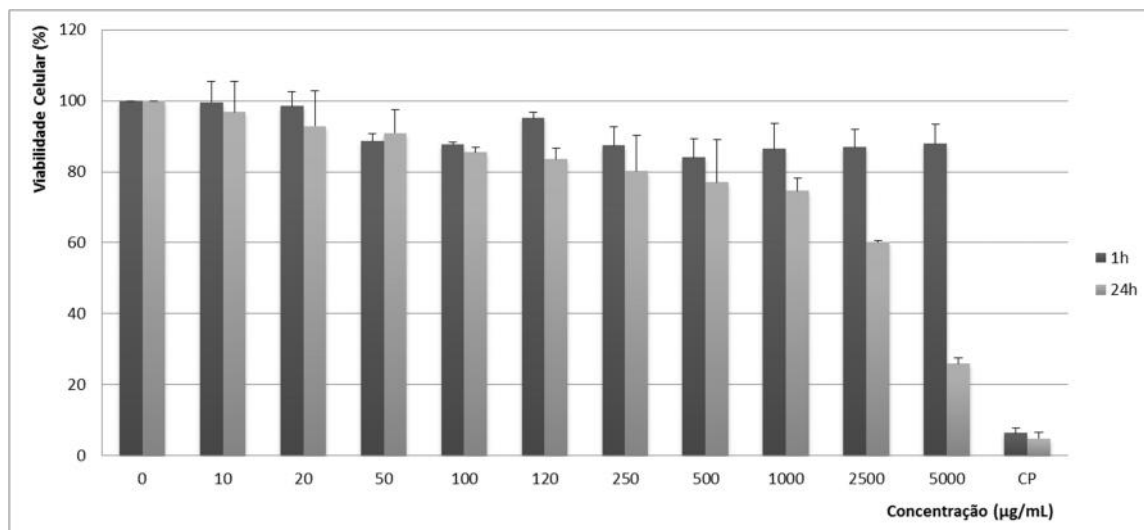


Figura 20. Viabilidade celular pelo ensaio MTT para o extrato aquoso de pétalas de açafrão após 1 e 24 horas de exposição.

Como se pode observar na figura 20, o extrato aquoso não apresenta citotoxicidade para qualquer das concentrações quando exposto uma hora (viabilidade celular superior a 80%). No entanto, quando as células são expostas durante 24 horas, observa-se um aumento da citotoxicidade a partir da concentração 2500 µg/mL.

Para 24 horas de exposição, o maior nível de citotoxicidade foi observado para o extrato com concentração de 5000 µg/mL, que induziu uma viabilidade celular inferior a 30%.

Proliferação Celular

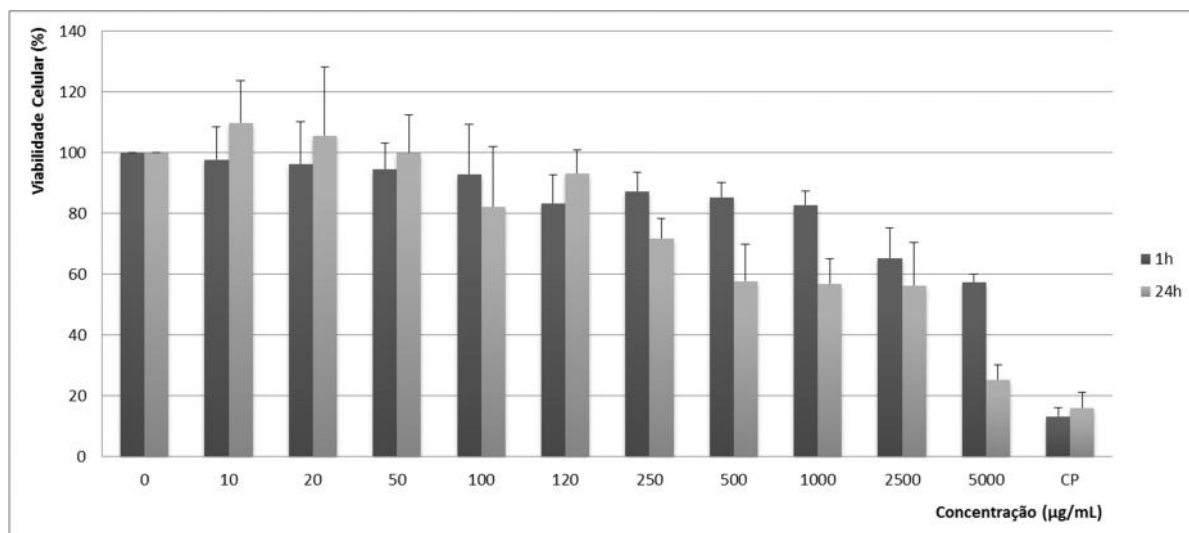


Figura 21. Proliferação celular após exposição do extrato aquoso de pétalas de açafrão durante 1 e 24 horas.

Após 48 horas de incubação das células a 37 °C (Fig. 21), pode concluir-se que o extrato aquoso, até à concentração de 1000 µg/mL, não interfere na proliferação celular, quando exposto durante 1 hora (viabilidade celular superior a 80%). Para concentrações superiores, verifica-se que a replicação celular é comprometida, sendo no entanto a viabilidade celular sempre superior a 50%.

Quando as células são expostas 24 horas ao extrato aquoso, verifica-se que a viabilidade celular para as concentrações de 10 µg/mL e 20 µg/mL é superior a 100%, após as 48 horas de recuperação celular. Os valores acima de 100% justificam-se pela variabilidade de resposta das células saudáveis, bem como pelo número variável de células em cada poço.

Para 1 hora de exposição, o extrato com concentração de 5000 µg/mL foi o que mais interferiu na proliferação celular, sendo no entanto a viabilidade celular superior a 50%.

Para 24 horas de exposição, a maior interferência na replicação celular foi observada para o extrato com concentração de 5000 µg/mL cuja viabilidade celular é inferior a 30%.

Extrato Hidroalcoólico

Viabilidade Celular

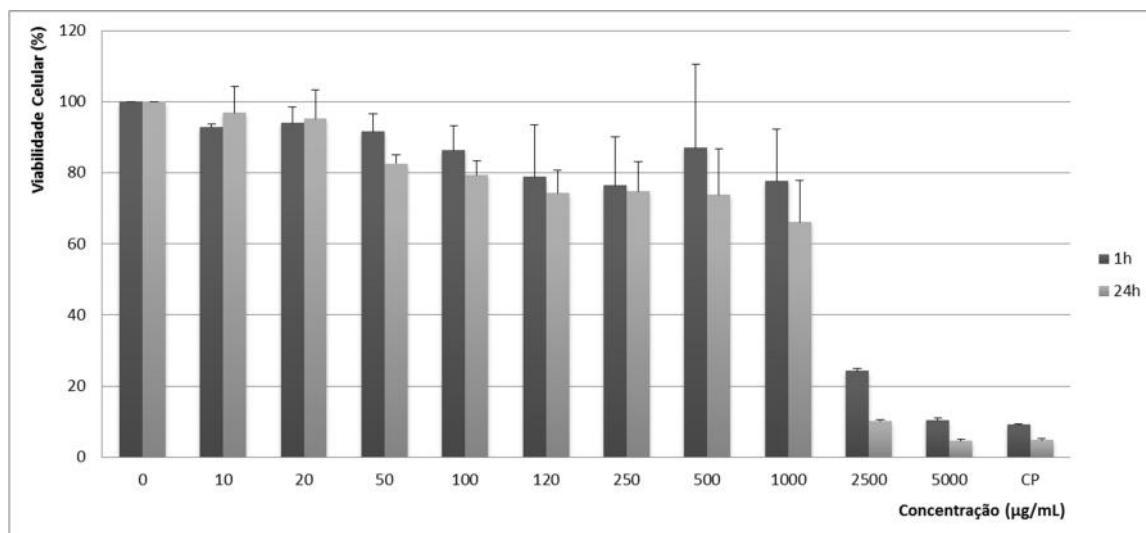


Figura 22. Viabilidade celular pelo ensaio MTT para o extrato hidroalcoólico de pétalas de açafrão após 1 e 24 horas de exposição.

Como se pode observar na figura 22, o extrato hidroalcoólico não apresenta citotoxicidade até à concentração de 1000 µg/mL, quando exposto uma hora (viabilidade celular superior a 60%). No entanto, quando as células são expostas a uma concentração superior (2500 µg/mL e 5000 µg/mL) observa-se um decréscimo da viabilidade celular acentuado (viabilidade celular inferior a 30%).

Quando as células são expostas durante 24 horas ao extrato hidroalcoólico, observa-se um aumento gradual da citotoxicidade a partir da concentração de 10 µg/mL até ao extrato de concentração de 2500 µg/mL, o qual provoca um decréscimo na viabilidade celular acentuado. Contudo, até à concentração de 1000 µg/mL a viabilidade celular correspondente é superior a 60%.

Proliferação Celular

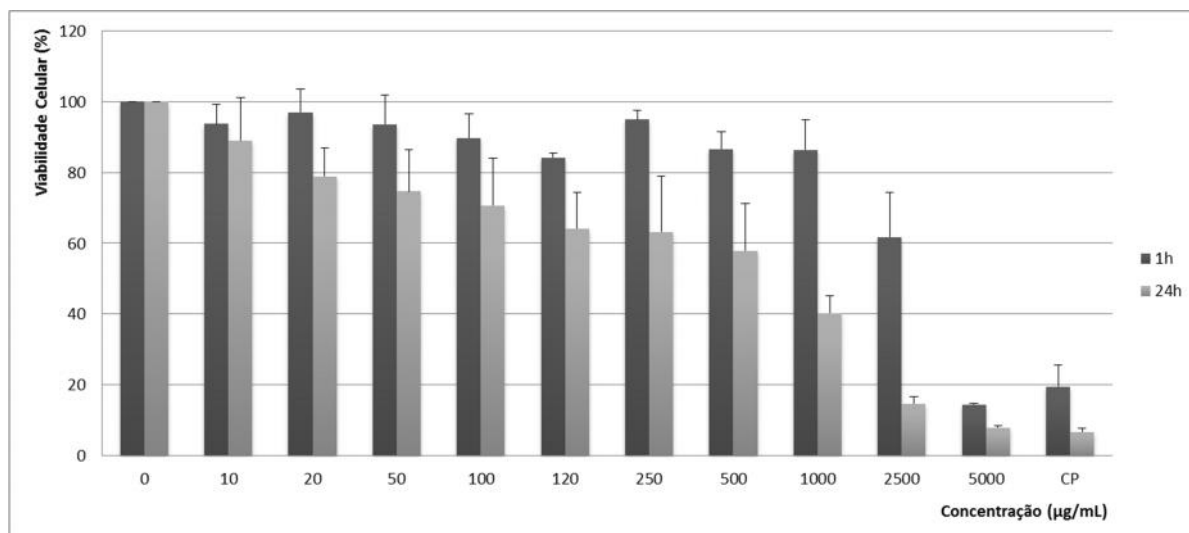


Figura 23. Proliferação celular após exposição do extrato hidroalcoólico de pétalas de açafrão durante 1 e 24 horas.

Após análise da figura 23, verifica-se que o extrato hidroalcoólico (após 48 horas de incubação das células a 37 °C), até à concentração de 2500 µg/mL, não interfere na proliferação celular quando exposto 1 hora, até à qual se observa uma viabilidade celular superior a 60%. Com o mesmo tempo de exposição verifica-se que, para concentrações superiores, a replicação celular é comprometida. Na verdade, para o extrato de concentração de 5000 µg/mL a viabilidade celular é inferior a 20%.

Quando as células são expostas 24 horas ao extrato hidroalcoólico antes das 48 horas de incubação verifica-se que a proliferação celular é mais afetada (inferior a 60% a partir da concentração 500 µg/mL) do que quando expostas apenas 1 hora.

Para 1 hora de exposição, os extratos com concentração de 2500 µg/mL e 5000 µg/mL foram os que mais interferiram na proliferação celular, sendo a viabilidade celular correspondente inferior a 20%.

Extrato Etanólico

Viabilidade Celular

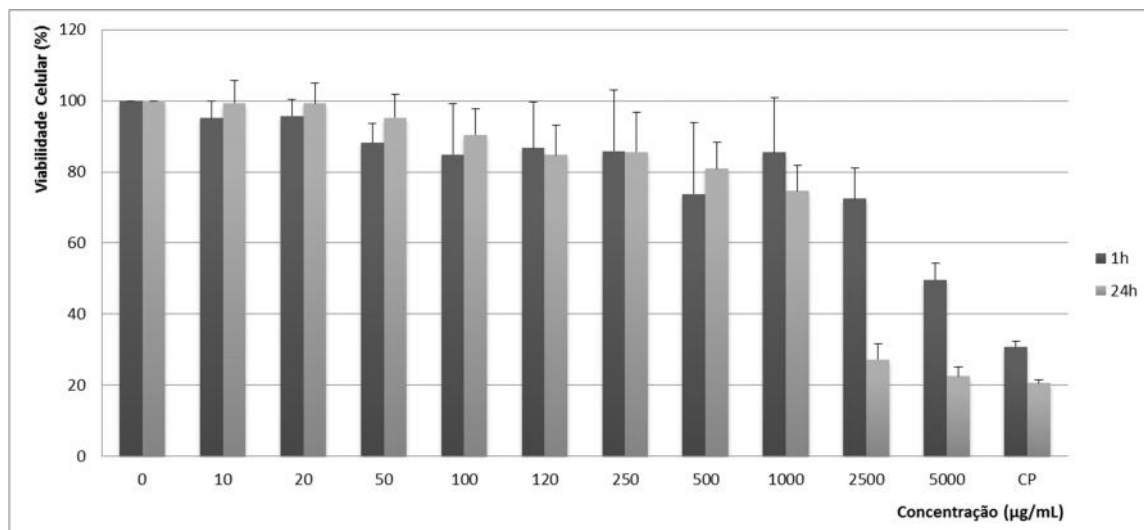


Figura 24. Viabilidade celular pelo ensaio MTT para o extrato etanólico de pétalas de açafrão após 1 e 24 horas de exposição.

Como se pode observar na figura 24, o extrato etanólico não apresenta citotoxicidade até à concentração de 2500 µg/mL quando exposto uma hora (viabilidade celular superior a 70%). No entanto, quando as células são expostas a um extrato com uma concentração superior (5000 µg/mL) observa-se um decréscimo da viabilidade celular (viabilidade celular inferior a 50%) e portanto um aumento da citotoxicidade.

Quando as células são expostas durante 24 horas ao extrato etanólico, observa-se um aumento gradual da citotoxicidade a partir do extrato com uma concentração de 10 µg/mL até ao extrato de concentração de 2500 µg/mL, o qual provoca um decréscimo acentuado na viabilidade celular. Ainda assim, até à concentração de 1000 µg/mL, a viabilidade celular correspondente é superior a 70%.

Proliferação Celular

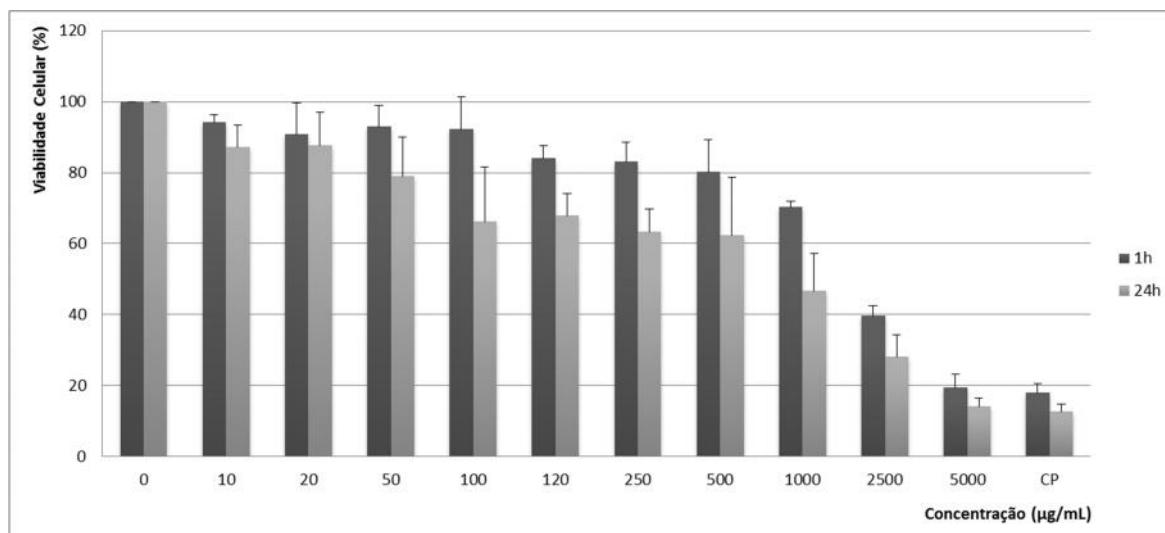


Figura 25. Proliferação celular após exposição do extrato etanólico de pétalas de açafrão durante 1 e 24 horas.

De acordo com a figura 25, é possível inferir que o extrato etanólico (após 48 horas de recuperação das células a 37 °C), até à concentração de 1000 µg/mL, não interfere na proliferação celular quando exposto 1 hora, até à qual se observa uma viabilidade celular superior a 60%. Com o mesmo tempo de exposição verifica-se que, para concentrações superiores, a replicação celular é comprometida, resultando numa viabilidade celular inferior a 20% para o extrato de concentração 5000 µg/mL.

Quando as células são expostas 24 horas ao extrato antes das 48 horas de incubação, verifica-se que a proliferação celular é mais afetada (inferior a 60% a partir da concentração 1000 µg/mL) do que quando expostas apenas 1 hora.

Tanto para 1 hora de exposição como para 24 horas, os extratos com concentração de 2500 µg/mL e 5000 µg/mL foram os que mais interferiram na proliferação celular, sendo a viabilidade celular inferior a 40 % e 20%, respetivamente.

De uma forma geral, os extratos induziram uma diminuição da viabilidade celular dependente da concentração, particularmente pronunciada na exposição de 24 horas (mas também observável após 1 hora de exposição para os extratos etanólico e hidroalcoólico). A comparação entre os diferentes extratos testados mostra que o aquoso é o que apresenta menos toxicidade para células Caco-2, onde uma diminuição da viabilidade celular é observada apenas após 24 horas de exposição.

De acordo com os ensaios preliminares realizados, dentro de determinadas concentrações, as pétalas de açafrão não comprometem a viabilidade celular intestinal, utilizando como modelo Caco 2.

Anteriormente foi mostrado que as pétalas não apresentam citotoxicidade contra fibroblastos 3T3 (Serrano-díaz *et al.*, 2014). No entanto, apenas foram ensaiadas concentrações de extrato entre 0,9 µg/mL e 900 µg/mL, para as quais não foi igualmente verificada toxicidade para células Caco-2. Num outro estudo, as pétalas de açafão foram utilizadas *in vivo* para estudar o efeito antidepressivo, tendo sido administrados 15 mg de liofilizado, 2 vezes por dia, com poucos efeitos secundários (Moshiri *et al.*, 2006).

Existem outros extratos naturais que são citotóxicos a concentrações muito mais baixas, sendo exemplo disso os orégãos (500 µg/mL, Caco-2), o rosmaninho (250 µg/mL, Caco-2), a salva ((250 µg/mL, Caco-2), (Aherne *et al.*, 2007) o gengibre (20 µg/mL, Mia Paca-2) (Kuate *et al.*, 2011), plantas utilizadas frequentemente na alimentação mediterrânica e o próprio açafão (400 µg/mL, HepG-2) (Abdullaev *et al.*, 2003).

Estes trabalhos indicam que mais estudos, quer *in vitro* quer *in vivo*, seriam necessários para se compreender os efeitos tóxicos das pétalas de *Crocus sativus* L..

Conclusão

A sustentabilidade é um desafio que a sociedade atual tem de enfrentar. Dentro dessa política e no âmbito alimentar, impõe-se a produção de alimentos para responder às necessidades de uma população crescente, a nível global, sem esgotar os recursos. Como tal, a reutilização de resíduos e a valorização de subprodutos são fundamentais para responder a uma política sustentável, a nível ambiental, económico e social.

Nesse sentido, o presente trabalho pretendeu valorizar as pétalas de *Crocus sativus* L., uma parte da planta desperdiçada na produção do açafrão, a especiaria mais cara do mundo. Os estudos foram realizados com o intuito de perceber as potencialidades de alguns extratos (aquoso, alcoólico e hidroalcoólico) destas pétalas, tendo em conta a presença de compostos bioativos e a sua ação antioxidante, antimicrobiana e citotoxicidade.

Embora o extrato hidroalcoólico tenha apresentado, de uma forma geral, melhores resultados, o extrato aquoso foi o que apresentou menor citotoxicidade. Este extrato revelou igualmente capacidade antioxidante e um teor de fenólicos próximo dos valores obtidos para o extrato hidroalcoólico. A utilização destes extratos, usando solventes pouco tóxicos, visou a sua possível introdução na indústria alimentar, cosmética ou farmacêutica.

As pétalas de *Crocus sativus* L. demonstraram ser uma matriz promissora. O estudo descrito contém apenas parte dos ensaios efetuados. Este trabalho constituiu, por isso, um ponto de partida para a valorização de um subproduto da produção da especiaria *Crocus sativus* L.

Referências Bibliográficas

Abdullaev FI, Riverón NL, Caballero OH, Manuel HJ, Pérez I, Pereda MR. Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). *Toxicology in Vitro*. **2003**, 17(5-6):731–6.

Acosta EBA, Gutiérrez UJA, Serna SSO. Bound phenolics in foods: Review. *Food Chemistry*. **2014**, 152:46–55.

Aherne SA, Kerry JP, O'Brien NM. Effects of plant extracts on antioxidant status and oxidant-induced stress in Caco-2 cells. *The British Journal of Nutrition*. **2007**, 97(2):321–8.

Agourram A, Ghirardello D, Rantsiou K, Zeppa G, Belviso S, Romane A. Phenolic content, antioxidant potential, and antimicrobial activities of fruit and vegetable by-product extracts. *International Journal of Food Properties*. **2013**, 16(5):1092–104.

Allen DD, Caviedes R, Cárdenas AM, Shimahara T, Segura-Aguilar J, Caviedes PA. Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. **2005**, 31(8):757–68.

Alves RC, Costa ASG, Jerez M, Casal S, Sineiro J, Núñez MJ. Antiradical activity, phenolics profile, and hydroxymethylfurfural in espresso coffee: Influence of technological factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58(23):12221–9.

Antunes P, Machado J, Peixe L. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2006**, 58(2):297–304.

Azapagic A, Perdan S, Clift K. Sustainable development in practice: Case studies for engineers and scientists. **2004**, West Sussex, UK: John Wiley & Sons.

Babaie A, Abdollahpoor S, Mahmoudi A, Fattahi SH. Saffron Stigma Separation by Oscillating Separator and Wind Tunnel. *Modern Applied Science*. **2012**, 6(7):101–14.

Ballesteros S, Fernández RA, Villaverde R, Escobar H, Pérez-Díaz JC, Baquero F. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. **1996**, 38(1):39–45.

Barreira JCM, Ferreira ICFR, Oliveira MBPP, Pereira JA. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. Food Chemistry. **2008**, 107(3):1106–13.

Barreira JCM, Ferreira ICFR, Oliveira MBPP, Pereira JA. Antioxidant potential of chestnut (*Castanea sativa* L.) and almond (*Prunus dulcis* L.) by-products. Food Science and Technology International. **2010**, 16(3):209–16.

Barros M, Branquinho R, Grosso F, Peixe L, Novais C. Emergence of methicillin and linezolid resistant ST2/CC5 *Staphylococcus epidermidis* in Portugal: First Cases Report. Emerging Infectious Diseases. **2014**, 20:5

Bathaie SZ, Mousavi SZ. New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. **2010**, 50(8):761–86.

Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”. Analytical Biochemistry. **1996**, 239(1):70–6.

Branquinho R. Unveiling population diversity, biosurfactants and antibacterial agents production of *Bacillus pumilus* group species. Tese de Doutoramento. **2014**. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Portugal

Brassfield M. The origin of herbs and spices. **2008**. Disponível em:
http://www.lifescrypt.com/food/articles/article_archive/t/the_origin_of_herbs_and_spices.aspx

Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. International Journal of Food Microbiology. **2004**, 94(3), 223–253.

Chang ST, Chen PF, Chang SC. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. Journal of Ethnopharmacology. **2001**, 77:123–127.

Cheok CY, Chin NL, Yusof YA., Talib RA., Law CL. Optimization of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) extractions from mangosteen

(*Garcinia mangostana* L.) hull using ultrasonic treatments. *Industrial Crops and Products*. **2013**, 50:1–7.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute – Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria – Standard M45-A **2006**; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Costa ASG, Alves RC, Vinha AF, Barreira SVP, Nunes MA., Cunha LM. Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. *Industrial Crops and Products*. **2014**, 53:350–7.

Fecka I. Qualitative and quantitative determination of hydrolysable tannins and other polyphenols in herbal products from meadowsweet and dog rose. *Phytochemical Analysis*. **2009**, 20(3):177–90.

Fowler SA, Stacy DM, Blackwell HE. Design and synthesis of macrocyclic peptomers as mimics of a quorum sensing signal from *Staphylococcus aureus*. *Organic Letters*. **2008**, 10(12):2329–32.

Garcia-Olmo DC, Riese HH, Escribano J, Ontañón J, Fernandez JA, Atienzar M. Effects of long-term treatment of colon adenocarcinoma with crocin, a carotenoid from saffron (*Crocus sativus* L.). *Nutrition and Cancer*. **1999**, 35(2):120–126.

González MR, Gloria LM, González M. Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry*. **2010**, 119(3):1030–9.

Goupy P, Vian MA, Chemat F, Caris-Veyrat C. Identification and quantification of flavonols, anthocyanins and lutein diesters in tepals of *Crocus sativus* L. by ultra performance liquid chromatography coupled to diode array and ion trap mass spectrometry detections. *Industrial Crops and Products*. **2013**, 44:496–510.

Grosso F, Quinteira S, Poirel L, Novais Â, Peixe L. Role of common blaOXA-24/OXA-40-carrying platforms and plasmids in the spread of OXA-24/OXA-40 among *Acinetobacter* species clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. **2012**, 56(7):3969–3972.

Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jiang Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*. **2003**, 23(12):1719–1726.

Halvorson S. Saffron cultivation and culture in central Spain. *Focus on Geography*. **2008**, 51(1):17–24.

Hansen MB, Nielson SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of Immunology Methods*. **1989**, 119:302–10.

Hasan I, Ansari AH, Sherwani AMK, Zulkifle M. The incredible health benefits of saffron: A Review. *Journal of Pharmacy Research*. **2011**, 4(7):2156–2158.

Holder AL, Goth R, Lucas D, Koshland CP. Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. *Chemical Research in Toxicology*. **2012**, 25(9):1885–92.

Holley RA, Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. **2005**, 22(4):273–292.

Hosseini SA, Mokhtari F, Rahimmalek M. Phenolic compounds and antioxidant activity from saffron (*Crocus sativus* L.) Petal. *Journal of Agricultural Science*. **2012**, 4(10):175–82.

Hossain MB, Brunton NP, Wilkinson M. Antioxidant Activity of spice extracts and phenolics in comparison to synthetic. *Rasayan Journal of Chemistry*. **2008**, 1(4):751–756.

Jeanjean, **2014**. Disponível em: <http://www.jeanjean.com/2.cfm?p=355-sustainable-development> [Acedido em 17-06-2014].

Jollivet M. “Eléments pour une réflexion interdisciplinaire sur le concept de développement durable. Un point de vue de sciences sociales”. *Natures Sciences Sociétés*. **1998**, 6(4): 50-52.

Kafi M, Koocheki A, Rashed MH, Nassiri M. Saffron (*Crocus sativus* L.) production and processing. **2006**. Science Publishers.

Karimi E, Oskoueian E, Hendra R, Jaafar HZE. Evaluation of *Crocus sativus* L.: stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. *Molecules*. **2010**, 15(9):6244–56.

Kates RW, Clark WC, Corell R, Hall JM, Jaeger CC. Environment and development. *Sustainability Science*. **2001**, 292(5517):641-642

Khazaei KM, Jafari SM, Ghorbani M, Kakhki AH. Microencapsulation of saffron petals's anthocyanins. *Carbohydrate Polymers*. **2014**, 105:57-62

Kim IS, Yang MR, Lee OH, Kang SN. Antioxidant activities of hot water extracts from various spices. *International Journal of Molecular Sciences*. **2011**, 12(6):4120–31.

Kuete V, Krusche B, Youns M, Voukeng I, Fankam AG, Tankeo S. Cytotoxicity of some Cameroonian spices and selected medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. **2011**, 134(3):803–12.

Lee JH, Lee HJ, Choung MG. Anthocyanin compositions and biological activities from the red petals of Korean edible rose (*Rosa hybrida*). *Food Chemistry*. **2011**, 129(2):272–8.

Lélé SM. Sustainable development: A critical review. *World Development*. **1991**, 19(6):607-621.

Lin JT, Chen YC, Lee YC, Rolis CW, Chen FL, Yang DJ. Antioxidant, anti-proliferative and cyclooxygenase-2 inhibitory activities of ethanolic extracts from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Science and Technology*. **2012**, 49(1):1–7.

Lobner D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis. *Journal of Neuroscience Methods*. **2000**, 96(2):147–52.

Mafra I, Silva SA, Moreira EJMO, Silva CSF, Oliveira MBPP. Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. *Food Control*. **2008**, 19(12):1183–90.

Magalhães ML, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*. **2008**, 613:1–19

Maggi L, Sánchez AM, Carmona M, Kanakis CD, Anastasaki E, Tarantilis PA. Rapid determination of safranal in the quality control of saffron spice (*Crocus sativus* L.). Food Chemistry. **2011**, 127(1):369–73.

Melnik JP, Wang S, Marcone MF. Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. Food Research International. **2010**, 43(8):1981–9.

Montoro P, Maldini M, Luciani L, Tuberoso CIG, Congiu F, Pizza C. Radical scavenging activity and LC-MS metabolic profiling of petals, stamens, and flowers of *Crocus sativus* L. Journal of Food Science. **2012**, 77(8):C893–900.

Moon JK, Shibamoto T. Antioxidant assays for plant and food components. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2009** 57(5):1655–66.

Moshiri E, Basti AA, Noorbala AA, Jamshidi AH, Hesameddin AS, Akhondzadeh S. *Crocus sativus* L. (petal) in the treatment of mild-to-moderate depression: a double-blind, randomized and placebo-controlled trial. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology. **2006**, 13(9-10):607–11.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunology. **1983**, 65:55-63.

Ndhlala AR, Moyo M, Staden JV. Natural antioxidants review: fascinating or mythical biomolecules. Molecules. **2010**, 15:6905-6930

Pacôme OA, Bernard DN, Sékou D, Allico D, David NGJ, Mongomaké K. Phytochemical and antioxidant activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Petal Extracts. Research Journal of Pharmaceutical. **2014**, 5(1453):1453–65.

Periago PM., Conesa R, Delgado B, Fernández PS, Palop A. Bacillus megaterium spore germination and growth inhibition by a treatment combining heat with natural antimicrobials. Food Technology and Biotechnology. **2006**, 44(1):17–23.

Pezon C. Intercommunalité et durabilité des services d'eau et d'assainissement en France et en Europe. Programme Politique Territoriale et Développement Durable 2003-2006. Ministère de L'écologie et du Développement Durable. Rapport Final, Décembre **2006**

Phipps SM, Sharaf MHM, Butterweck V. Assessing antioxidant activity in botanicals and other dietary supplements. *Pharmacopeial Forum*. **2007**, 33(4)

Pintado C, Miguel A, Acevedo O, Nozal L, Novella JL, Rotger R. Bactericidal effect of saffron (*Crocus sativus* L.) on *Salmonella enterica* during storage. *Food Control*. **2011**, 22(3-4):638–42.

Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-CARBA: an easy biochemical test to detect diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. **2013**, 51(12):4281-4283.

Pitsikas N, Boultadakis A, Georgiadou G, Tarantilis PA, Sakellaris N. Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L.. *Phytomedicine*. **2008**, 15(12):1135–1139.

Prior R, Cao G. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: A review. *Journal of AOAC International*. **2000**, 83(4):950-956.

Rios J, Recio M. An update review of saffron and its active constituents. *Phytotherapy Research*. **1996**, 10:189–93.

Saima K. Saffron (*Crocus sativus* L.). *Economic Review*. **2009**, Vol. 21.

Sánchez AM, Carmona M, Campo CPD, Alonso GL. Solid-phase extraction for picrocrocin determination in the quality control of saffron spice (*Crocus sativus* L.). *Food Chemistry*. **2009**, 116(3):792–8.

Sarma DSK, Babu AVS, Division P. Pharmacognostic and phytochemical studies of *Thespesia populnea* L. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. **2011**, 3(4):237–44.

Satomi M, La Duc MT, Venkateswaran K. *Bacillus safensis* sp., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **2006**, 56(8):1735–40.

Serrano-Díaz J, Sánchez AM, Maggi L, Martínez TM, García DL, Murcia MA. Increasing the applications of *Crocus sativus* flowers as natural antioxidants. *Journal of Food Science*. **2012**, 77(11):C1162–8

Serrano-Díaz J, Sánchez AM, Martínez TM, Winterhalter P, Alonso GL. A contribution to nutritional studies on *Crocus sativus* flowers and their value as food. Journal of Food Composition and Analysis. **2013**, 31(1):101–8

Serrano-Díaz J, Estevan C, Sogorb MÁ, Carmona M, Alonso GL, Vilanova E. Cytotoxic effect against 3T3 fibroblasts cells of saffron floral bio-residues extracts. Food chemistry. **2014**, 147:55–9.

Sheng L, Qian Z, Zheng S, Xi L. Mechanism of hypolipidemic effect of crocin in rats. European Journal of Pharmacology. **2006**, 543(3):116–122.

Spiertz H. Food production, crops and sustainability: Restoring confidence in science and technology. Current Opinion in Environmental Sustainability. **2010**, 2(5):439-443.

Srivastava R, Ahmed H, Dixit RK, Dharamveer, Saraf SA. *Crocus sativus* L.: A comprehensive review. Pharmacognosy Reviews. **2010**, 4(8):200–8.

Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control. **2010**, 21(9):1199–218.

Tavakkol AJ, Brook A, Mousavi SH. Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines. Food and Chemical Toxicology. **2008**, 46(11):3443–7.

Torelli A, Marieschi M, Bruni R. Authentication of saffron (*Crocus sativus* L.) in different processed, retail products by means of SCAR markers. Food Control. **2014**, 36(1):126–31.

Tsai PJ, McIntosh J, Pearce P, Camden B, Jordan BR. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) extract. Food Research International. **2002**, 35(4):351–6.

Tsuda T. Anthocyanins as Functional Food Factors. Food and Science Technology. **2012**, 18(3):315–24.

Wang TA , Sun XA, Peng XC, Zhai YA, Chu ZA, Zhang HA, Kang TA, Chen H. Determination of total tannins in the roots, branches, leaves and pericarps of *Juglans mandshurica*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*. **2011**, 36(1):32-36

WSO - World Spice Organization, **2014**. Disponível em: Wsospice.org [Acedido entre 23-05-2014 e 18-06-2014]

Vega AE, Pugsley MK. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. **2011**, 54:10–4.

Vijaya G. Detailed Profile of *Crocus sativus* L.. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. **2011**, 2(1):530–41.

Vinha A, Soares M, Castro A, Santos A, Oliveira MBPP, Machado M. Phytochemical characterization and radical scavenging activity of aqueous extracts of medicinal plants from Portugal. *European Journal of Medicinal Plants*. **2012**, 2(4): 335-347

Yassa N, Masoomi F, Hadjiakhoondi A. Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Extract and Essential oil of *Rosa damascena* from Iran. Population of Guilan. **2009**, 17(3):175–81.

Yosemite, **2014**. Disponível em: <http://yosemite.epa.gov/r10/oi.nsf/Sustainability/History> [Acedido entre 29-05-2014 e 17-06-2014]

Zhou C, Sun C, Chen K, Li X. Flavonoids, Phenolics, and Antioxidant Capacity in the Flower of *Eriobotrya japonica* L.. *International Journal of Molecular Sciences*. **2011**, 12(5):2935–45.

Zougagh M, Simonet BM, Ríos A, Valcárcel M. Use of non-aqueous capillary electrophoresis for the quality control of commercial saffron samples. *Journal of Chromatography A*. **2005**, 1085(2):293–8.

Zougagh M, Ríos A, Valcárcel M. Determination of total safranal by in situ acid hydrolysis in supercritical fluid media: Application to the quality control of commercial saffron. *Analytica Chimica Acta*. **2006**, 578(2):117–21.

Zulueta A, Esteve MJ, Frígola A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*. **2009**, 144:310–316.